

# Facultad de Ciencias

# notas

## *de clase*

Manual de guías de laboratorio  
genética mendeliana, poblaciones,  
citogenética y genética molecular

Eugenio Andrade  
Marta Lucía Bueno  
Consuelo Burbano  
Alejandro Chaparro  
Luis Fernando García  
Nubia Matta  
Guiomar Nates  
William Usaquén

Biología

Estadística

Farmacia

Física

Geología

Instituto de Ciencias Naturales

Matemáticas

Observatorio Astronómico

Química



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
UNIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**MANUAL DE GUÍAS DE LABORATORIO  
GENÉTICA MENDELIANA, POBLACIONES,  
CITOGÉNÉTICA Y GENÉTICA MOLECULAR**

**EUGENIO ANDRADE  
MARTA LUCIA BUENO  
CONSUELO BURBANO  
ALEJANDRO CHAPARRO  
LUÍS FERNANDO GARCÍA  
NUBIA MATTA  
GUIOMAR NATES  
WILLIAM USAQUÉN**

**BOGOTÁ, JUNIO DE 2005**

©

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
UNIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**MANUAL DE GUÍAS DE LABORATORIO  
GENÉTICA MENDELIANA, POBLACIONES,  
CITOGÉNÉTICA Y GENÉTICA MOLECULAR**

**BOGOTÁ, JUNIO DE 2005**

©

---

## Índice General

---

GENÉTICA MENDELIANA	1
1 Dermatoglifos	1
2 Un modelo cromosómico	15
3 Aproximación a los principios de Mendel sobre transmisión de caracteres hereditarios	21
4 La probabilidad en el análisis genético	29
5 Prueba de degustación de la FTC	37
6 Cianogénesis en trébol blanco ( <i>Trifolium repens</i> )	45
GENÉTICA DE POBLACIONES	50
7 Equilibrio de Hardy-Weinberg	51
8 Microevolución y selección natural	59

9 Subestructura genética de poblaciones	65
CITOGENÉTICA	73
10 Aspectos básicos de citogenética humana	73
11 Cromosomas politenicos	85
12 Cromosomas mitóticos en médula ósea de <i>Mus musculus</i>	97
13 Mitosis y meiosis en células vegetales	105
14 Cromosomas metafásicos en <i>Drosophila</i>	117
15 Determinación de la cromatina sexual	123
16 Meiosis en testículo de ratón	133
17 Cromosomas en abejas	139
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	148
18 Estructura y propiedades de los ácidos nucleicos y sus técnicas de estudio	149
19 Herramientas para un estudio directo de la estructura del DNA	159
20 El DNA: molécula portadora de información	165
21 Clonación y purificación del gen bacteriano <i>Lys A</i>	171
22 Organización de un gen de Levadura	177
23 Secuencia, transcripción y traducción del gen <i>spo IIG</i>	181

---

<b>24 La síntesis de proteínas</b>	<b>187</b>
<b>25 Extracción y visualización de ácidos nucleicos</b>	<b>195</b>
<b>26 Reacción en cadena de polimerasa</b>	<b>203</b>
<b>27 Análisis del DNA con enzimas de restricción</b>	<b>213</b>
<b>28 Software Vector View</b>	<b>219</b>



---

## *Introducción*

---

La Unidad de Genética, Biología Celular y Molecular del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias presenta un compendio de guías y talleres de laboratorio usadas en las prácticas de las asignaturas Genética molecular, citogenética, Genética mendelina y de poblaciones del plan curricular de la Carrera de Biología. En algunos casos consisten en talleres que ilustran tópicos relevantes en la genética moderna, en otros casos, logramos atender la inquietud de los estudiantes de desarrollar practicas de laboratorio con la tecnología reciente de la biología molecular y la llamada bioinformática. Algunas de las guías corresponden a ejercicios tradicionalmente desarrollados en los libros de texto de la literatura relacionada con la genética, pero que se encontraban desactualizadas o sin traducir al español. En esos casos se han hecho algunas modificaciones, y el crédito respectivo a los autores de las mismas se dan al final en las referencias en cada caso. En otros casos los docentes de la Unidad de Genética, y Biología Molecular plantean nuevas prácticas dentro del contexto de sus intereses en investigación, en un esfuerzo por incorporarlo en la práctica docente.

Es necesario aclarar que muchas de estas guías fueron inicialmente desarrolladas, o planteadas por profesores adscritos a esta unidad y quienes en la actualidad se encuentran retirados y a quienes queremos dar el mérito correspondiente por su esfuerzo y colaboración, ellos son los profesores Guillermo Rozo, Indiana Bustos, Dilia de Boada y Fernando Nuñez

Recientemente los profesores de la Unidad actualizamos muchas de esas guías, además de incorporar nuevas generando éste documento. Los profe-



sores adscritos a la fecha a esta unidad y que participaron en la elaboración del presente documento son: Eugenio Andrade Marta Lucia Bueno, Consuelo Burbano, Alejandro Chaparro, Luís Fernando García, Nubia Matta, Guiomar Nates y William Usaquen.

Los Monitores del Área de Genética participaron en la edición de este manual Javier Vanegas Guerrero, Alejandro Silva, Alejandro Balbín y Nohra Rodríguez.

Esperamos que este manual de guías sea utilizado tanto por los estudiantes de Biología y carreras afines en la Universidad Nacional, sino por otras Universidades en el país.

Profesores Unidad de Genética y Biología Molecular  
Departamento de Biología  
Universidad Nacional  
Bogotá, Octubre de 2004

# CAPÍTULO 1

---

## *Dermatoglifos*

---

### Introducción

Los dermatoglifos son el conjunto de surcos epidérmicos o líneas dermopapilares que se observan en las palmas y los dedos de las manos, así como en los dedos y plantas de los pies. Desde el punto de vista embriológico y genético, las líneas dermopapilares se distinguen por su pronta diferenciación durante los primeros meses de vida intrauterina y permanecen constantes, es decir, no sufren variación con la edad, nutrición, clima y otros factores postnatales.

### Anatomía

Los dermatoglifos están relacionados con las *crestas* epidérmicas (Fig. 1.1) que forman un sistema de líneas paralelas, en campos pequeños de la superficie del estrato córneo. Los poros de las glándulas sudoríparas se localizan a lo largo del centro de estas crestas. Las depresiones entre las crestas se conocen como surcos. Internamente, bajo la epidermis, se encuentra el estrato germinativo, los pliegues glandulares y los pliegues de los surcos. Los estudios dermatoglifos pueden efectuarse de manos o pies. En las Figuras 1.2 y 1.3 se encuentran la nomenclatura empleada para identificar estas áreas.

## Dimensiones

Tradicionalmente se considera el ancho entre dos crestas como la distancia existente entre los puntos centrales entre dos crestas consecutivas. Para calcular esta distancia promedio, se traza una línea de un centímetro que corte en ángulo recto una serie de crestas y se cuenta el número de ellas cortado por la línea. Para cuantificar las impresiones dactiloscópicas, se emplea también el conteo total de crestas o CTC (Fig. 1.4). Para esto se cuentan en cada una de las impresiones digitales el número de líneas que son cortadas por una recta que une el centro geométrico del trirradio con el centro de la configuración palmar (Fig. 1.5).

Algunos elementos pueden ser detallados en el estudio exacto de los dermatoglifos; trataremos de identificar algunos de ellos de acuerdo con la nomenclatura empleada para su descripción (Fig. 1.6).

- Isla o Punto: Es una pequeña cresta de forma redondeada que contiene un solo poro.
- Cortada: Es un fragmento de una cresta más largo que una isla y puede contener dos o tres poros.
- Línea Intersticial: Es una pequeña línea angosta, muy rara vez contiene poros; en general son más bajas que las crestas y no se consideran cuando se hace el conteo de crestas.
- Cerco: Es una bifurcación y posterior unión de una cresta que rodea un surco, formando una laguna.
- Bifurcación: Es la división de una línea, formando una Y.
- Peine: Es una configuración de una línea, en la cual tres o más crestas confluyen.
- Anastomosis: Es la unión de dos líneas por intermedio de una línea subsidiaria.

## Principales configuraciones

### Campos abiertos

Son áreas llenas de líneas paralelas o casi rectas. Se designan generalmente con la letra "O". Entre las configuraciones más frecuentes en estas áreas

están los *arcos* que se forman cuando las líneas son un poco curvas, los *abanicos* que se forman en áreas por múltiples bifurcaciones de las crestas. Si las bifurcaciones se hacen en sentidos opuestos el resultado es una configuración, que se conoce como *escalera*.

### Trirradios

Son formados cuando hay discontinuidad en líneas paralelas. Geométricamente, el *punto del trirradio* (Fig. 1.5a) es el punto de encuentro de tres líneas radiales que hacen entre ellas ángulos cercanos a  $120^\circ$ . En la Fig. 1.5 se presentan los diferentes tipos de confluencia de las líneas; en cada caso el punto geométrico del trirradio se encuentra marcado con un círculo. Idealmente el trirradio está representado por una bifurcación de la cual irradian tres líneas. Algunas veces el centro está marcado por una isla (Fig. 1.5b) o por el fin de una cortada (Fig. 1.5c). En algunos casos el centro geométrico no reposa sobre ninguna línea (Fig. 1.5d y 1.4e), si el trirradio ocurre en una región con un *peine*, el punto geométrico se toma en el punto donde los tres ángulos sean lo más cercanos posibles a los  $120^\circ$  (Fig. 1.5e). Configuraciones con arcos verdaderos carecen de trirradios.

### Impresiones digitales

En las impresiones digitales se reconocen tres tipos principales de configuraciones, *presillas*, *Verticilos* o *torbellinos* y los *arcos*.

Presillas (L): Las presillas pueden ser de diferentes tipos (Fig. 1.7). En *varilla*, cuando están conformadas por líneas casi paralelas con una cresta central (Fig. 1.7a) o en forma de *aro* o *argolla* cuando el centro es libre (Fig. 1.7b). En la Fig. 1.7c se esquematiza la *presilla convergente* o *invadida*, y la *ganchosa* o *nutable* en la Fig. 1.7d. Los arcos en tienda (Fig. 1.7e) son los únicos arcos que poseen trirradio. Algunas configuraciones presentan un patrón característico de dos trirradios, como las *presillas dobles* o los *verticilos* (Fig. 1.7d y 1.7e). Tres trirradios son también posibles en configuraciones que presentan verticilos y presillas como la esquematizada en la Fig. 1.9.

Verticilos (W): Este grupo incluye todas las muestras cuyas líneas presentan contornos circulares en forma de “S”, *elípticas* o *espiriliformes*. Los verticilos constituyen los patrones más complejos y variables. Una forma simple (w) consta de un patrón concéntrico circular o elíptico (Fig. 1.8 a y b). Las configuraciones pueden ser muy variadas (Fig. 1.8), y se pueden encontrar figuras con dos o tres trirradios, los cuales se diferencian por la configuración central y orientación de las figuras.

Arcos (A): Los arcos se forman cuando las líneas están un poco curvas (Fig. 1.4) y se emplea el término Arc para denotarlos. Un tipo particular de arco es el *arco en tienda* que presenta un trirradio en la base.

### La palma de la mano

Existen seis áreas bien definidas que corresponden a las regiones o pliegues embrionarios. Estas son las *áreas hipotenares* (Fig. 1.2, H), *tenares* (Th), y las *interdigitales*, I, II, III, y IV. Normalmente existen cuatro trirradios interdigitales, en la base de los dedos y son denotados a, b, c, d. (Fig. 1.2). Un trirradio adicional puede presentarse en el área interdigital y en esos casos se denota como a', b', c', d', de acuerdo con el área interdigital en la cual se encuentre localizado.

Trirradios Hipotenares: El principal es un trirradio localizado en la palma y próximo al lugar de pliegue de la mano, normalmente en el eje o cerca del eje del cuarto metacarpiano y se conoce como "t" (tabla 1.1). Cuando la posición de este trirradio es más distal, tiene el aspecto de una T invertida, cuyo pie estaría dirigido hacia la eminencia hipotenar, se le llama "t'".

La posición "t''", es mediopalmar, muy distal y tiene forma de Y mayúscula. Una medida objetiva para la situación de t viene representada por la magnitud del ángulo que forman los trirradios extremos a y d con el trirradio t, denominado *ángulo de Penrose*, o *atd* Fig 1.10.

Medida del ángulo	Tipo de posición
$< 45^\circ$	Posición t
$45^\circ - 56^\circ$	Posición t'
$> 56^\circ$	Posición t''

**Tabla 1.1** Tipo de posición del ángulo de Penrose según su medida.

### Fórmula dactiloscópica

La fórmula dactiloscópica consiste en la expresión resumida a través de símbolos de los patrones dermatoglíficos verificados en los dedos de las manos. Se presenta de acuerdo al sistema propuesto por Vucetich (1858-1925), famoso dactiloscopista yugoslavo, como una fracción en la cual el numerador resume los patrones de los dedos de la mano derecha y el denominador la mano izquierda. De acuerdo con este sistema, todos los arcos están designados por la letra A en el pulgar y el # 1 en los otros dedos. Los verticilos son designados por la letra V en el pulgar y con el # 4 en cualquiera de los otros dedos. Las presillas se consideran *internas* cuando el trirradio está a la derecha del observador y se designan con la letra I (en el pulgar) y con

el # 2 para los otros dedos. La letra E y el # 3 se emplean para presillas *externas*, con el trirradio izquierdo o externo.

**Ejemplo:** E-3333/I-2222

Significan: Mano derecha, presillas externas, que se abren para el lado *ulnar* en todos los dedos. En la izquierda, todas son presillas internas.

### La planta del pie

Las impresiones plantares son homólogas a las verificadas en las palmas de las manos como se observa en la Fig. 1.3b. Las únicas diferencias consisten en considerar el *área tenar* como distal si está cerca del *área halucal* (del dedo gordo), y proximal, la cercana al Calcáneo. Con respecto a los trirradios correspondientes a los dedos II a V son designados como a, b, c, d, respectivamente. El trirradio de la región halucal se denota como e, y dependiendo de su posición, pueden ser empleadas las letras e para el más proximal y e' para el más distal.

Un trirradio generalmente muy próximo al área halucal es el trirradio p (proximal). Cuando está desplazado hacia el área hipotenar distal puede llamarse p' o p'' dependiendo del desplazamiento.

### Objetivos

- Reconocer los principales patrones normales de las líneas dermatopapilares de las manos, y los pies, expresando los resultados en una fórmula dactiloscópica resumida.
- Establecer la frecuencia de los patrones palmares entre los estudiantes de la clase.
- Comparar los patrones individuales con los padres y hermanos para establecer el tipo de herencia de estos rasgos.
- Discutir las aplicaciones de estos estudios en las poblaciones como marcadores genéticos y como ayuda diagnóstica para algunos síndromes genéticos.

## Materiales

- Papel para dermatoglifos
- Rodillo
- Tiza
- Estereoscopio
- Compás de dos puntas
- Tinta
- Talcos
- Fotocopiadora
- Regla milimetrada
- Transportador

## Procedimiento

Para la mayor parte de las necesidades médicas, basta el examen de las manos y los pies utilizando una lupa, pero en el caso de que se requiera un registro permanente de los surcos dérmicos con el fin de poder hacer un análisis cuantitativo, se obtiene una impresión de los mismos empleando tintas especiales, talcos, o con tiza y una buena fotocopiadora.

El procedimiento, es en general, el mismo, sea cual fuere el sistema escogido, se resaltan los surcos epidérmicos con la tinta, talco, o tiza y seguidamente se toma la impresión sobre papel directamente en el caso de la tinta, o sobre una máquina fotocopiadora en el caso del talco o la tiza. La impresión debe obtenerse por una presión firme de la mano o pie en una superficie dura.

Tome su impresión dactilar, tanto para la mano derecha como para la izquierda. Identifique en ella:

- Las principales configuraciones en los campos abiertos O.
- Localice la posición de los trirradios palmares. ¿De qué tipo sería?
- Escriba la fórmula dactiloscópica resumida de su patrón palmar
- Calcule el ángulo atd. De acuerdo con éste valor, ¿Qué posición tiene el trirradio axial?
- Calcule la distancia media entre crestas para los dedos y el CTC (conteo total de crestas).
- Identifique en los patrones palmares los principales tipos de elementos. ¿En qué área están localizadas?
- Establezca su fórmula dactiloscópica de acuerdo con el formulario anexo.
- Realice el conteo total de cresta.

- Tome los dermatoglifos de sus padres, y/o hermanos y compare las fórmulas dactiloscópicas.
- En una tabla consignen los resultados de la clase y sus familiares y establezca las frecuencias de las formas dactilares (Arcos, verticilos, bucles)

## Cuestionario

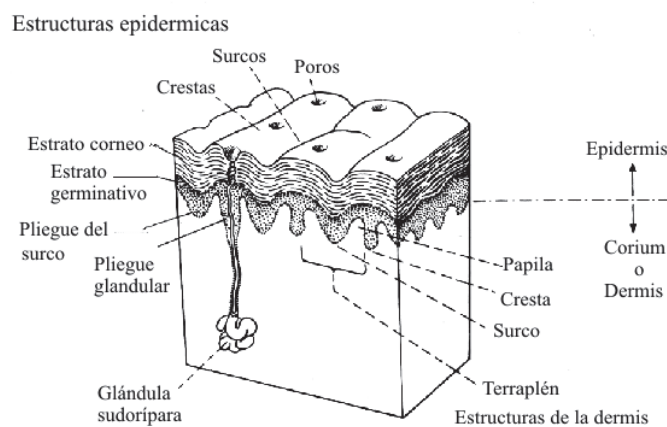
1. ¿En que consiste un pliegue simiesco, y cuando se observa?
2. ¿Qué influencias externas pueden modificar o inducir cambios en los dermatoglifos?
3. Señale algunos de los trastornos clínicos que están claramente asociados con anomalías en los dermatoglifos.
4. ¿Que tipo de herencia tiene los dermatoglifos?
5. ¿Cuales son las frecuencias encontradas en el grupo para cada una de las figuras dactilares?

## Bibliografía citada

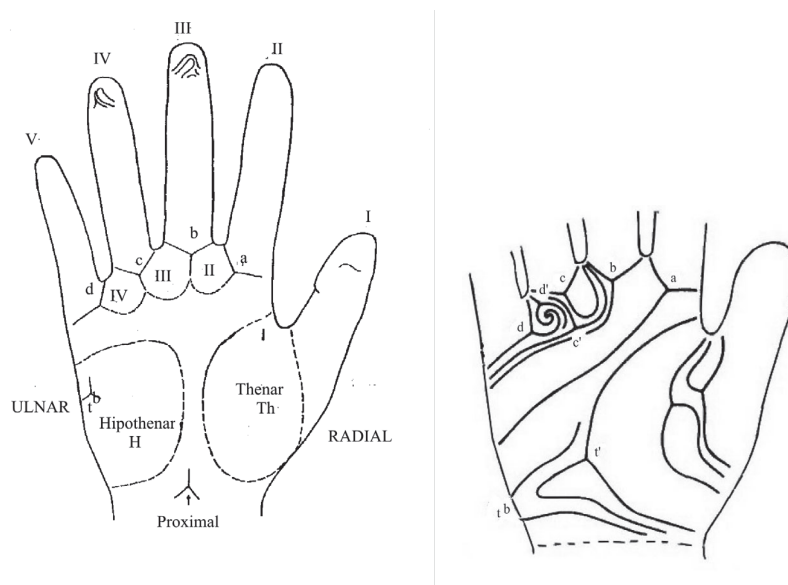
- Beiguelman B.** 1982. Citogenética Humana. Guanabara, Koogan. Rio de Janeiro. 326 pp.
- Egozcue J, Antich J, Ballesta F. et al.** 1976. Genética Médica. Espaxs. Barcelona. 533 pp.
- Penrose LS.** 1968. Memorandum on Dermatoglyphic Nomenclature. Bergsma. Birth Defects Original Series IV (3):1-13.
- Schaumann B y Alter M.** 1976. Dermatoglyphics in medical disorders. Springer-Verlang. New York. 252 pp.
- Thompson JS y Thompson MW.** 1979. Genética Médica. Salvat Editores. S.A.
- Vargas MV.** 1982. Dermatoglifos en individuos con síndrome de Down. Tesis para optar el título de bióloga Universidad Nacional de Colombia.



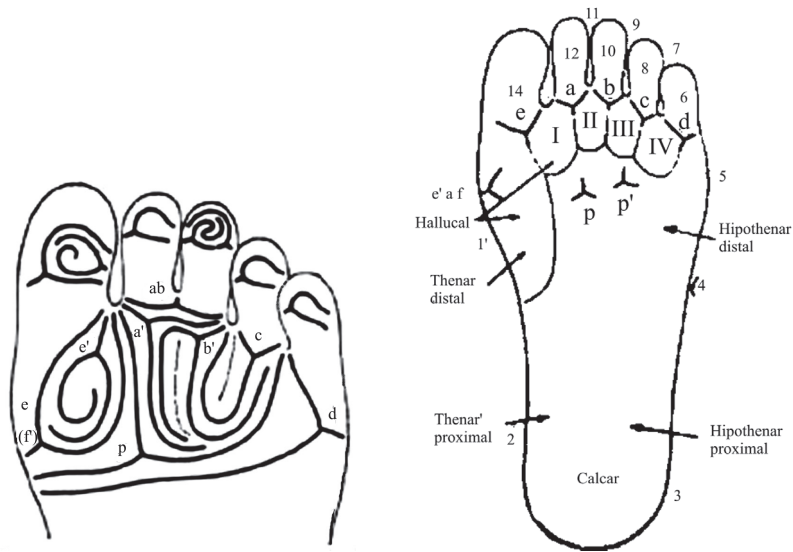
## Figuras de Dermatoglifos



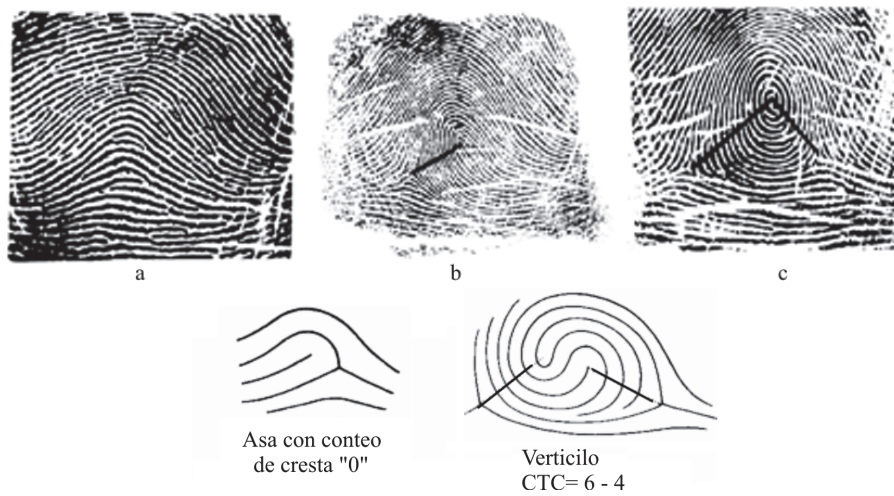
**Figura 1.1** Representación diagramática de los pliegues de la piel con la nomenclatura de las estructuras de la epidermis y dermis (Penrose 1968). Memorandum of dermatoglyphic nomenclature. Birth defects 4(3):1. Penrose 1968.



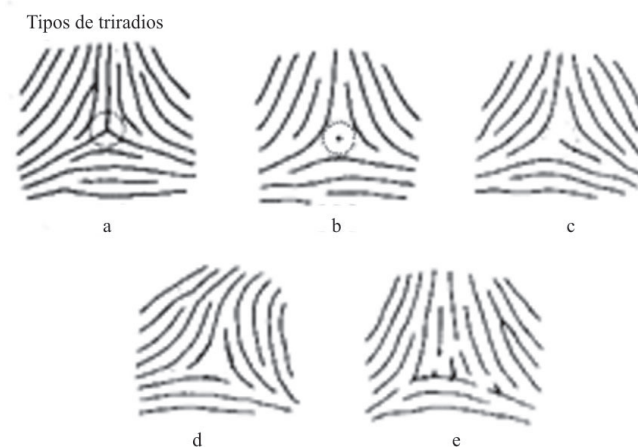
**Figura 1.2** Nomenclatura y posición de áreas y trirradios en manos. Penrose 1968.



**Figura 1.3** Nomenclatura y posición de áreas y trirradios en pies. Penrose 1968.



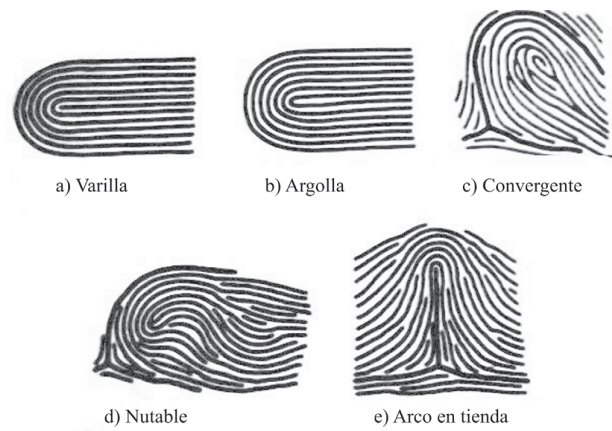
**Figura 1.4** Conteo de crestas. En los arcos, por definición carecen de trirradios y el conteo de crestas es o-o (A), Los bucles con un trirradio, tiene en este caso 16-0 (B), en la espiral en (C), el número de crestas a cada uno de los trirradios puede ser diferente:14-10. Penrose 1968.



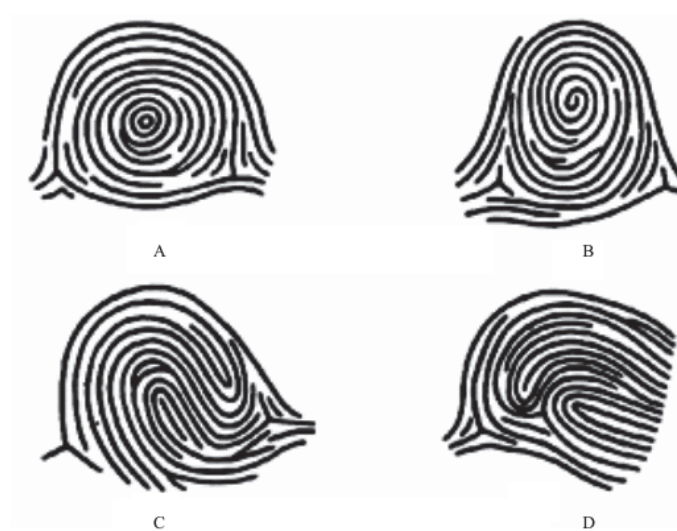
**Figura 1.5** Los triradios están conformados por la confluencia de tres sistemas de crestas. (A) El centro geométrico de confluencia del triradio se denomina punto del triradio. Idealmente es la confluencia de las tres líneas, puede estar representado por un punto (B), o la terminación de una cresta (C). En otros casos (D,E) esta en espacios abiertos intersticial. Penrose 1968.



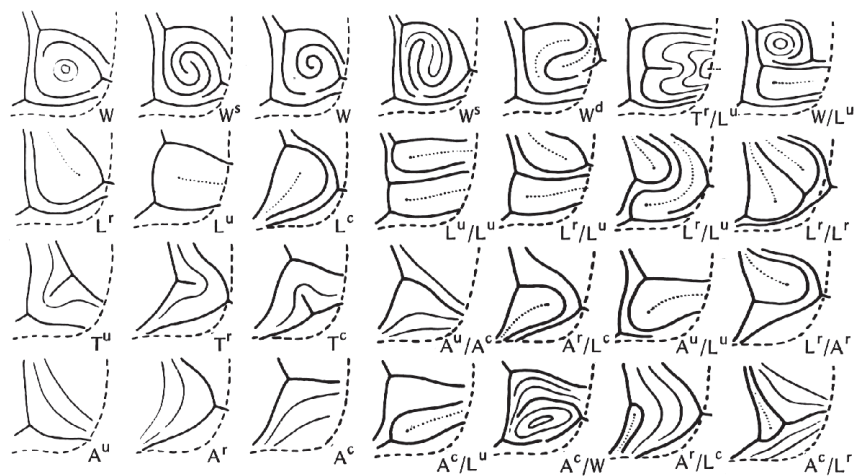
**Figura 1.6** Nomenclatura empleada en la descripción de las formas finas que presentan las crestas. Penrose 1968. Penrose 1968.



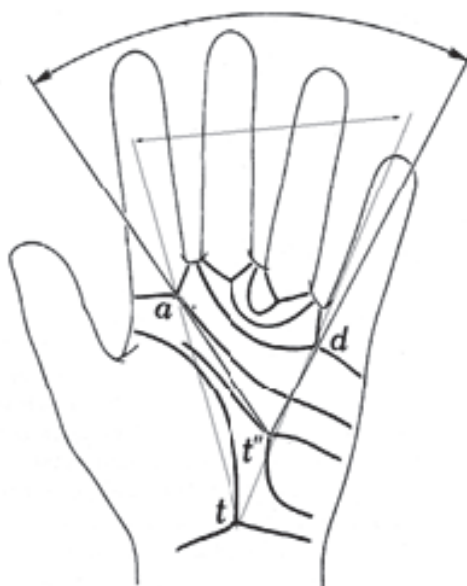
**Figura 1.7** Las presillas (L) pueden ser de diferentes tipos a) Varilla, cuando están conformadas por líneas casi paralelas con una cresta central, b) en forma de aro o argolla cuando el centro es libre, c) presilla convergente o invadida, y d) ganchosa o nutable. Los arcos en tienda e) son los únicos arcos que poseen trirrudio. Penrose 1968.



**Figura 1.8** Verticilos simples (A y B) y bucles o asas dobles. Penrose 1968.



**Figura 1.9** Varios tipos de patrones en el área hipotenar. W, verticilos; L, bucles; T, arcos en tienda, A, arcos simples. Los súper índice determinan la dirección. r, radial; u, ulnar; c, carpal; d, patrón doble; s, espiral.



**Figura 1.10** Medida del Angulo “atd” de la palma de la mano. Observe que entre más distal este el triradio t, mas pequeño es el ángulo.

## DERMATOGLIFOS

Nombre: \_\_\_\_\_

Las convenciones empleadas son:

Arcos		A — Pulgar 1 — Otros dedos
Presillas, Trirradio a la derecha	Interna o Tenar	I — Pulgar 2 — Otros dedos
Trirradio a la Izquierda	Externa o Ulnar	E — Pulgar 3 — Otros dedos
Verticilos		V — Pulgar 4 — Otros dedos

X: Si no se puede definir por cicatriz o daño de la impresión

Fórmula Observada:

Mano	Pulgar	Indice	Medio	Anular	Meñique
Derecha					
Izquierda					

Ejemplos:

1. Fórmula Observada:

Mano	Pulgar	Indice	Medio	Anular	Meñique
Derecha	V	4	4	4	4
Izquierda	V	4	4	4	4

Presencia de verticilos en todos los dedos

## 2. Fórmula Observada:

Mano	Pulgar	Indice	Medio	Anular	Meñique
Derecha	A	3	3	4	1
Izquierda	V	2	2	2	2

Mano derecha: Arco en el pulgar, presillas en los dedos índice y medio, verticilo en el anular y arco en el meñique.

Mano izquierda: Verticilo en el pulgar, presillas tenares o internas en los otros dedos.

## Conteo total de crestas (CTC)

Otro de los parámetros descriptivos de las impresiones dactilares es el CTC, que se efectúa trazando con lápiz una línea (Línea de Galton) entre el trirradio más próximo y el centro nuclear de la figura.

Nota:

No se cuentan las líneas del trirradio

Si la figura tiene dos trirrados (verticilos. Círculos concéntricos, etc.) se considera el conteo mayor.

Los arcos en Tienda, arcos planos, abanicos, que no tienen trirradio, su conteo es de cero.

CTC = Conteo del número de líneas en las impresiones de los diez dedos.

## Conteo total de crestas (CTC):

Mano	Pulgar	Indice	Medio	Anular	Meñique	Total
Derecha						
Izquierda						

## Impresiones Palmares

Localizar los trirrados digitales a, b, c, d. Si existen otros adicionales se designaran como a', b', c', d'.

Localizar los trirrados palmares y determinar si hay uno o más y describir su posición, trirradio axial proximal ( t ), en forma de Y invertida, axial distal ( t'' ) una Y en posición normal, o un trirradio en posición intermedia entre t y t'.

Para clasificar el trirradio palmar puede usarse el ángulo de Penrose (1949): *atd*.

Este ángulo es formado por los segmentos de recta que se trazan uniendo los trirrados digitales a y d con el trirradio palmar. Entre más distal este el trirradio palmar menor será el ángulo *atd*. Se considera que es t, para ángulos menores de 58 grados.

## CAPÍTULO 2

---

### *Un modelo cromosómico*

---

#### **Introducción**

Adaptación de: Pashley M. 1994. A chromosome model. Journal of Biological Education 28(3): 157-161.

Cuando los estudiantes se ven enfrentados por primera vez con la genética, se encuentran frente a conceptos abstractos difíciles de manejar. Los errores concernientes a la relación entre los términos “gene” y “alelo” pueden ser de tres categorías: 1. Los genes contienen alelos 2. Los alelos contienen genes y 3. Alelos y genes son las misma cosa. Tales errores causan problemas con muchos de los otros términos usados en genética y eso afecta el desempeño del estudiante en este tópico. El modelo que se va a trabajar pretende aclarar y afianzar términos tales como: alelos, dominante, recesivo, homocigoto, heterocigoto, alelos múltiples, ligamiento, y recombinación que permitirá un mayor acercamiento hacia mapas génicos de algunos organismos.

#### **El modelo**

Este modelo se basa principalmente en la construcción de cromosomas, con sus respectivos genes, tomando como base alguno de los cromosomas de los



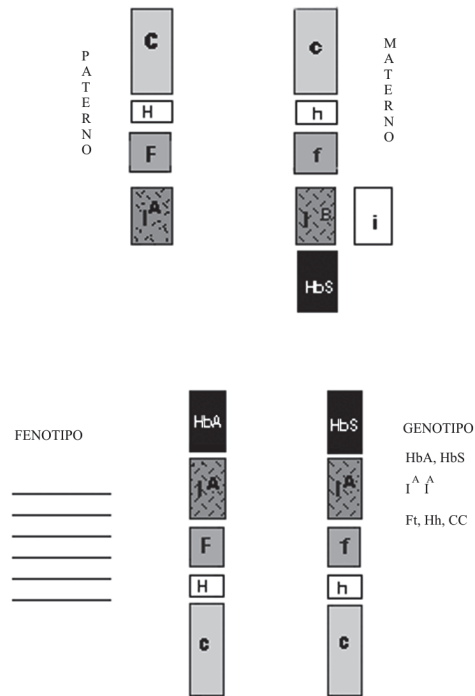
siguientes organismos: *Homo sapiens* u otros primates, *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum*, y *Zea mays*,. Cada grupo de estudiantes seleccionará uno de estos organismos e iniciará su trabajo de la siguiente forma:

1. Revisión bibliográfica sobre mapa génico de la especie seleccionada.
2. De un cromosoma particular, seleccionar por lo menos 5 genes que reúnan las siguientes condiciones: a) 2 de ellos están ubicados en un brazo cromosómico y los tres restantes en el otro. b) un gene, por lo menos, debe pertenecer a un sistema de alelos múltiples, c) otro gene diferente debe presentar un sistema de herencia con dominancia parcial, d) codominancia.
3. Investigue acerca de las características seleccionadas (forma de herencia, fenotipo que exhibe, distancia entre los genes, etc.).
4. Construcción de los cromosomas: Para esto se necesitan 2 trozos de madera fuerte ó de cartón paja, de  $50 \times 6$  cm. Cada uno de estos trozos simula un cromosoma (paterno y materno) y esta dividido en 5 segmentos de diferente tamaño, cada uno de los cuales representa 5 loci. Los alelos están representados por bloques de madera que corresponden exactamente a cada uno de los segmentos (locus). Los “cromosomas” y los “genes” deben estar pintados del mismo color. Cada grupo deberá tener dos cromosomas paternos y dos maternos; cada gene debe estar repetido 4 veces (p. ej.; 4 recesivos y 4 dominantes)

## Métodos

### 1. Procedimiento A

Inicialmente trabajaremos con un cromosoma hipotético de *Homo sapiens*,: Características usadas: Cada uno de los 5 pares de genes estará determinando una característica definida, pueden ser: fibrosis cística (dos alelos: C y c), Grupo ABO (tres alelos:  $I^A$ ,  $I^B$ , i), Corea de Huntigton (dos alelos: H y h), fenilcetonuria-PKU- (dos alelos: F y f) y anemia falciforme (dos alelos codominantes HbA y HbS). Cada uno de los alelos estará representado por un bloque de madera del tamaño correspondiente al “locus” respectivo y marcado ya sea con colores diferenciales o letras (Las características usadas aparecen sobre el mismo cromosoma, pero realmente eso no ocurre así).



En las figuras anteriores se ilustran los cromosomas gaméticos, los genes y alelos y un ejemplo de par cromosómico con las cinco características. Anote el fenotipo del ejemplo de la figura anterior.

Utilizando los modelos, arme “3 personas” con fenotipos y genotipos diferentes.

Para cada persona anote:

	Locus	Fenotipo	Genotipo
Persona 1			
Persona 2			
Persona 3			

## Cuestionario

1. ¿Piensa que puede haber variaciones en la disposición de estos 5 conjuntos de alelos? ¿Cuales?
2. ¿Como pueden algunas personas ser portadores del alelo para alguna de estas características y afectado para otras?
3. Invente otra persona que no sufra de ninguna de las enfermedades descritas pero que sea portador para Fenilcetonuria. ¿Cuál es el tipo sanguíneo de esta persona? ¿Cuales serían sus probables padres? ¿Que probabilidad tiene esta persona de pasar el alelo defectuoso a su primer hijo ó hija? Bajo que circunstancias un niño puede estar afectado de fenilcetonuria?
4. Altere el arreglo anterior de forma que Ud. tenga alguien que sufra de Corea de Huntington. Un hombre de 20 años descubre que su padre, que tiene 40 años, muestra signos de ésta enfermedad. ¿Cuál es la probabilidad de que ese hombre desarrolle también la enfermedad? A que se refiere esta enfermedad?
5. Haga un nuevo rearreglo de forma que el producto sea: grupo sanguíneo O, afectado de PKU, con fibrosis cística, pero sin señales de Corea de Huntington y es una persona de 65 años de Edad. Dibuje el cromosoma con este nuevo arreglo. ¿Cuál sería el genotipo de los padres de un individuo así? ¿De que otras formas pueden reorganizarse los alelos para producir éste individuo tan desafortunado?
6. Reorganice otra vez los alelos, esta vez para producir un individuo portador del alelo falciforme, y de grupo sanguíneo AB. ¿Que característica presentan los glóbulos rojos de los individuos portadores de la característica falciforme?
7. Discuta con sus compañeros las relaciones existentes entre las siguientes parejas de términos:

heterocigoto:alelo;  
dominante:alelo;  
gene:alelo;  
recesivo:dominante;

homocigoto:alelo;  
recesivo:alelo;  
heterocigoto:homocigoto;  
genotipo:fenotipo.

## 2. Procedimiento B

Utilizando sus respectivos modelos y según la especie que haya elegido, arme 5 individuos con fenotipos y genotipos diferentes. Idee la forma de representar genes ligados.

Para cada individuo anote: Locus, fenotipo, genotipo, % de ligamiento entre los genes que están ligados; frecuencia de recombinación esperada.

¿Cuántas combinaciones son posibles para los 5 loci génicos?

¿Cómo se construyen los mapas génicos?

## Apéndice

Fibrosis cística: C: alelo dominante responsable por la producción de una glicoproteína normal

c: alelo recesivo: responsable por la producción de glicoproteína anormal

Grupo sanguíneo ABO;  $I^A$  = alelo responsable por la síntesis del antígeno A

$I^B$  = alelo responsable por la síntesis del Antígeno B

i = alelo recesivo incapaz de producir cualquier antígeno

Corea de Huntington: H = alelo dominante causante de la enfermedad

h = alelo recesivo, normal.

Fenilcetonuria (PKU) F= alelo dominante responsable por la síntesis de fenilalanina hidroxylasa, que convierte la fenilalanina en tirosina

f= alelo recesivo que determina una enzima defectuosa, incapaz de convertir fenilalanina en tirosina.

Anemia falciforme: Alelos codominantes

HbA = alelo que produce hemoglobina normal (Hemoglobina A)

HbS = alelo responsable por la producción de hemoglobina anormal (Hemoglobina S).

## Bibliografía citada

- Ayala F y Kiger J.** 1984. Genética Moderna. Fondo Educativo Interamericano.
- Beiguelman B.** 1982. Citogenética Humana. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil.
- Lindsley D y Grell E.** (año) Genetic Variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publication No.627.
- O'Brien S, McKusick V.** 1992. Mendelian inheritance in man. 10 Edición The Johns Hopkins University Press.
- Seuanes H y Womack J.** 1985. On the evolution of genome Organization in Mammals. Cap. 8 de Molecular Evolutionary Genetics. 5198-587. Ed. by Ross Maelntyre.
- O'Brien SJ y Marshall Graves JA.** 1990. Report of the Committee on comparative gene Mapping Sokoloff, A. 1977. The Biology of Tribolium with emphasis in genetics aspects. Tomo II.
- Sutton HE.** An introduction of Human Genetic. 2 Ed. Holt Rinehart and Winston. New York.
- Thompson JS y Thompson MW.** 1979. Genética Médica. Salvat Editores.
- Thompson JS y Thompson MW.** 1991. Genetics in Medicine. 476-479. 4 $\frac{1}{4}$  Edición. Saunders Company.

## CAPÍTULO 3

---

### *Aproximación a los principios de Mendel sobre transmisión de caracteres hereditarios*

---

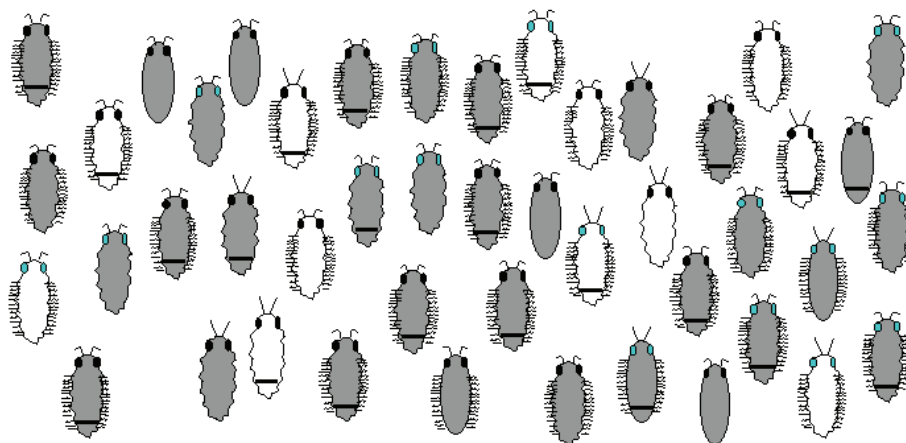
#### **Introducción**

En el presente taller se pretende estimular a los estudiantes para realizar una serie de observaciones que le permitan inferir los principios desarrollados por Gregor Mendel. Para tal objeto se diseñó un organismo hipotético que contiene una serie de caracteres. A medida que se avance en los ejercicios, la observación detallada y la cuantificación de las observaciones permitirán proponer un mecanismo para la transmisión hereditaria de dichos caracteres.

#### **Ejercicio No. 1:**

De una especie, a la cual usted deberá nombrar, se ha recolectado la población silvestre de la Fig. 3.1.

Sobre esta especie es importante aclarar que los individuos con una franja en el abdomen son hembras.



**Figura 3.1** Población silvestre de la especie en estudio.

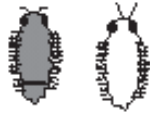
A partir de esta población desarrolle los siguientes puntos:

1. Establezca los caracteres morfológicos que presentan variabilidad para esta población y las variantes de cada carácter.
2. Proponga una nomenclatura de tal forma que permita la identificación de cada morfotipo.
3. Agrupe y cuantifique cada uno de los morfotipos diferentes que se presentan en esta población.
4. ¿Cuál es la frecuencia de cada morfotipo encontrado? Establezca frecuencias por carácter morfológico.
5. De acuerdo con los caracteres y variantes encontradas en esta población, ¿Cuál es el número máximo de morfotipos posibles que se pueden generar?
6. Describa las formas posibles que no fueron encontradas dentro de esta población.
7. ¿Qué puede usted comentar sobre esta población?

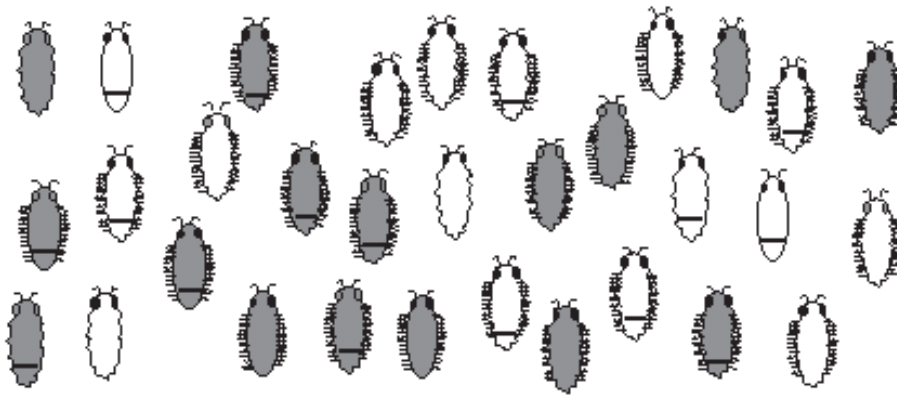
### Ejercicio No. 2:

A partir de una población criada en laboratorio se ha tomado una pareja y su descendencia (Fig. 3.2).

Parentales



Descendencia



**Figura 3.2** Población cultivada en el laboratorio.

Desarrolle los siguientes puntos:

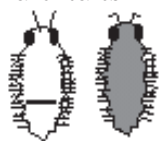
1. Establezca los caracteres morfológicos que presentan variabilidad para esta población y las variantes de cada carácter. Emplee la nomenclatura diseñada en la primera parte.
2. Agrupe y cuantifique cada una de las formas diferentes que se presentan en esta población.
3. ¿Cuál es la frecuencia de cada una de las formas encontradas?
4. Establezca frecuencias por carácter morfológico.
5. ¿Hay variantes que predominan dentro de esta población? ¿Cuales?
6. ¿Cuál es la relación entre las variantes para cada carácter?
7. Encuentra alguna relación con los conceptos estadísticos de independencia y de eventos mutuamente excluyentes. Discuta.



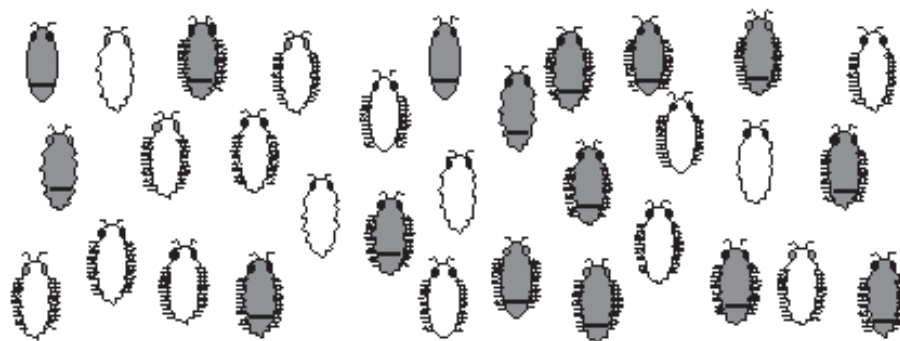
### Ejercicio No. 3:

Para este tercer ejercicio se ha tomado el cruce recíproco del ejercicio anterior. En la Fig. 3.3 se presenta la pareja tomada y su descendencia.

Parentales



Descendencia



**Figura 3.3** Cruce recíproco al presentado en el ejercicio No 2.

Desarrollar:

1. Establezca los caracteres morfológicos que presentan variabilidad para esta población y las variantes de cada carácter. Emplee la nomenclatura diseñada en la primera parte.
2. Agrupe y cuantifique cada una de las formas diferentes que se presentan en esta población.
3. Establezca frecuencias por carácter morfológico. ¿Cuál es la frecuencia de cada una de las formas encontradas?
4. ¿Cuales variantes predominan dentro de esta población?

5. Establezca la relación numérica entre estas variantes.
6. Discuta los resultados de este cruce con relación al cruce anterior.

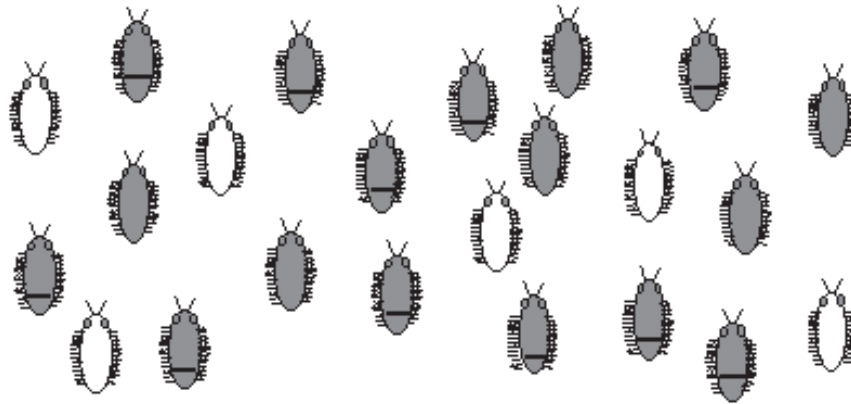
#### Ejercicio No. 4:

De otro grupo de individuos criados en condiciones de laboratorio se presenta en la Fig. 3.4 una pareja y su descendencia.

Parentales



Descendencia



**Figura 3.4** Cruce y descendencia de poblaciones cultivadas en laboratorio.

Desarrolle:

1. Repita todos los puntos 1 al 6 del ejercicio número 2.
2. Plantee una discusión en cuanto a la cantidad de formas obtenidas en este cruzamiento.

3. ¿Podría proponer un mecanismo de acción para la transmisión hereditaria de caracteres?

Si la respuesta es si, conteste las preguntas 4 y 5, salte las preguntas 6 y 7.  
Si la respuesta es no, pase a la pregunta 6.

4. Explique las observaciones que sustentan su propuesta de transmisión hereditaria de caracteres.
5. ¿Qué cruzamientos realizaría para verificar su propuesta y qué resultados esperaría?
6. ¿Que información necesitaría para proponer un mecanismo de acción para transmisión hereditaria de caracteres?
7. Como obtendría la información faltante.
8. Concluya sobre los resultados del taller.

## Bibliografía citada

- Daniel W.** 1997. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Tercera edición. Editorial Limusa. México D. F.
- Griffiths A. et al.** 2000. An introduction to genetic analysis. Séptima edición. Freeman and company. New York.
- Klug WS & Cummings M.** 1999. Conceptos de genética. Quinta edición. Prentice May Iberia. Barcelona.
- Kuspira J & Walker G.** 1973. Genetics: questions and problems. Primera edición. Mc Graw Hill. México D. F. New York.
- Laplace PS.** 1996. Ensayo filosófico sobre ls probabilidades. Ediciones Atalaya S. A. Barcelona. 140 p.
- Steel R & Torie J.** 1988. Bioestadística, principios y procedimientos. Segunda edición. Mc Graw Hill. México D. F.
- Strickberger M.** 1985. Genética. Tercera edición. Ediciones Omega S. A. Barcelona.

- 
- Walpole R & Myers P.** 1992. Probabilidad y estadística. Cuarta edición. Mc Graw Hill. México D. F.
- Zar J.** 1996. Biostatistical analysis. Tercera edición. Prentice Hall. New Jersey.



## CAPÍTULO 4

---

### *La probabilidad en el análisis genético*

---

#### **Introducción**

La probabilidad es un concepto implícito en la formación de los estudiantes de ciencias. Cuando se les interroga son capaces de hacer una aproximación intuitiva bastante clara; sin embargo, al momento de realizar la definición formal de la misma y al tratar de aplicar y mostrar la utilidad especialmente dentro del mundo biológico las cosas son muy diferentes. En el presente taller se propone el desarrollo del concepto básico de probabilidad y mostrar su aplicación dentro del análisis genético.

#### **Historia de la probabilidad**

En los textos frecuentemente se hace referencia al origen de la probabilidad como un problema de técnicas para apuestas y para juegos; sin embargo, las preguntas que derivaron en el desarrollo teórico para la formalización de esta disciplina provienen de otra parte.

La teoría formal de probabilidad fue un problema que se derivó desde la mecánica Newtoniana con los *Principia Matemática* de Sir Isaac Newton (1643 – 1727), donde se sientan las bases de una nueva comprensión del

universo alrededor de planteamientos universales y absolutos; sin embargo, ese modelo del mundo no dejaba espacio para la incertidumbre, para lo imprevisto y muchos de los fenómenos observados no eran coincidentes con lo teórico.

Pierre Simón de Laplace (1749 – 1827), matemático, físico y astrónomo francés se plantea a partir de este momento la tarea de escribir un trabajo que ofrezca una solución completa del gran problema mecánico que representa el sistema solar, de manera que los resultados de las observaciones coincidieran con los obtenidos por los cálculos matemáticos. Sus resultados fueron expuestos en *Exposition du systeme du monde* (1796) y *Traite de mecanique celeste* (1799 – 1825).

Con el Tratado de Mecánica Celeste, obra en 5 volúmenes publicados entre 1799 y 1825, se culmina el trabajo de más de un siglo de duración durante el cual Laplace reúne en un sólo cuerpo, una doctrina homogénea, todos los trabajos dispersos de Newton, Halley, Clairaut, D'Alembert, Euler, etc. De esta manera, y junto con sus propias aportaciones, recoge el conocimiento de su época sobre el movimiento de los cuerpos del Sistema Solar.

En esta obra desarrolla una serie de conceptos en términos de probabilidad como por ejemplo el incremento del peligro del choque entre un cometa y la tierra como una función dependiente del tiempo y no descarta que este evento se haya dado durante la historia del planeta.

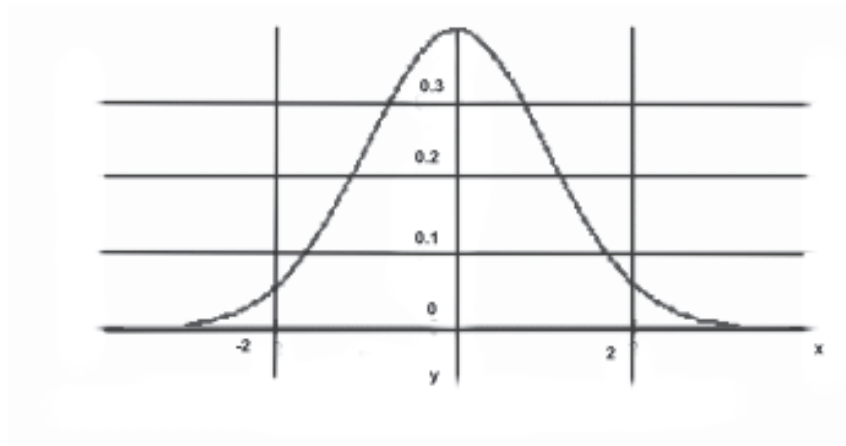
En 1812, con su obra *Théorie Analytique des Probabilités*, expone los principios y las aplicaciones de lo que él llama “geometría del azar”. Esta obra representa la introducción del análisis matemático en el estudio de fenómenos aleatorios y recopila toda una serie de memorias publicadas desde 1771 sobre el tema.

Laplace expresa de forma sencilla el significado del cálculo de probabilidades: “En el fondo, la teoría de probabilidades es sólo sentido común expresado con números”.

En la primera edición de esta obra se define probabilidad, las reglas de Bayes, establece los fundamentos de las técnicas de mínimos cuadrados, análisis de mortalidad y de esperanza de vida. Remarca la importancia de las implicaciones morales de la investigación matemática.

En una segunda edición da especial importancia al análisis de los errores, determinación aproximada de masas de los planetas, métodos de triangulación, problemas de geodesia y una probabilidad de duración de los matrimonios como una ayuda a la construcción de leyes sociales.

De esta época son notables sus trabajos sobre las probabilidades de mortalidad en los hospitales franceses en los que inicia el desarrollo de una curva representativa de las variaciones de dichas probabilidades como una función  $f$ , que hoy en día se denomina curva de campana o curva de Laplace–Gauss (Fig. 4.1).



**Figura 4.1** Curva de Laplace–Gauss.

La ley de Laplace–Gauss también se conoce con el nombre de ley de Gauss. Pero de hecho Laplace descubre esta ley en 1780 cuando Gauss (1777–1855) tenía tres años.

Para 1795 en la *Ecole Normale* de Francia dicta varios cursos de probabilidad para profesores de escuela y desarrolla los fundamentos de su obra “*Essai philosophique sur les probabilités*” que fue publicada en 1814. Con esta obra pretende dar a conocer los principios y aplicaciones de la geometría del azar pero sin aparato matemático alguno.

La importancia de esta materia la resalta Laplace con las siguientes palabras: “Es notable que una ciencia que comenzó con las consideraciones de juegos de azar había de llegar a ser el objeto más importante del conocimiento humano. Las cuestiones más importantes de la vida constituyen en su mayor parte, en realidad, solamente problemas de probabilidad”.



## Requerimientos teóricos para desarrollar la práctica

Para un adecuado desarrollo de este taller se recomienda leer con anterioridad los siguientes temas:

Concepto de Probabilidad, Definiciones de: Espacio Muestral, Eventos, Reglas aditivas, Probabilidad condicional, reglas multiplicativas, pruebas  $\chi^2$ , cálculo de proporciones genéticas, proporciones para segregación de dos o más genes, pruebas de independencia, tablas de contingencia. Teoría de conjuntos.

## Planteamiento del problema

A partir de cuatro caracteres genéticos se construirá un sencillo modelo que permitirá determinar la probabilidad de encontrar determinado morfotipo dentro del campus universitario. Con el aumento gradual en el tamaño de la población también se logrará establecer un modelo más confiable determinado por el tamaño de la población. Finalmente se determinará como funciona dicho modelo para casos de cruzamientos particulares y se realizará una discusión sobre las implicaciones de estos resultados en términos de la variabilidad genética en una población.

## Objetivos

- Introducir el concepto de probabilidad dentro del análisis genético.
- Desarrollar modelos básicos poblacionales.
- Observar el efecto del error en los tamaños poblacionales.
- Construir ecuaciones generales para una primera aproximación al concepto de variabilidad genética.

## Metodología

### Primera parte

En esta práctica se trabajará con cuatro caracteres morfológicos que se describen a continuación:

Carácter	Variantes Morfológicas
Enroscamiento de la Lengua	Enroscar / no enroscar
Lóbulo de la oreja	Suelto / Unido
Factor Rh – D	Positivo / Negativo
Grupo sanguíneo ABO	A / B/ AB / O

Estos son caracteres discretos de dominancia completa claramente diferenciables dentro de la población. El procedimiento de trabajo se describe a continuación:

1. Con el grupo de laboratorio (P1) realizar un censo sobre las variantes fenotípicas de estos caracteres y determinar la frecuencia de cada una de ellas.
2. Determinar las frecuencias de los morfotipos posibles con los cuatro caracteres morfológicos en estudio.
3. ¿Que método estadístico emplearía para determinar si existen diferencias entre sexos? Explique detalladamente.

## Segunda parte

Estos primeros valores representan el primer modelo de probabilidad construido y ahora se procede a la verificación de este respecto a otros grupos poblacionales

4. Ahora se debe incrementar el número de individuos en la muestra. Por grupos de tres personas se debe encuestar a diez personas de los siguientes departamentos.

Biología	Química
Física	Geología
Ingeniería de Sistemas	Artes
Medicina	Antropología

5. De la misma manera como se calcularon frecuencias para el grupo de genética se debe realizar este procedimiento para cada una de las siguientes poblaciones:

Grupo genética (P1)	Depto Biología (P2)
Facultad de Ciencias (P3)	Universidad Nacional (P4)

Observe que cada una es inmediatamente más grande que la anterior. Los datos tomados para el curso de genética deben entrar en los cálculos del departamento de Biología, a su vez estos dentro de los de Facultad de Ciencias y todas las personas encuestadas dentro del modelo Universidad Nacional.

6. Los datos se deben almacenar en una base de datos que tiene la siguiente estructura:

ID, Población, Sexo, Enroscamiento lengua, Lóbulo, Rh, ABO.

### Tercera parte

Se cuenta con varios modelos de probabilidad construidos con diferentes tamaños poblacionales, en esta parte se realizará una comparación entre ellos.

7. P1 y P4 presentan diferencias significativas para los caracteres estudiados? Realice las comparaciones necesarias y una discusión detallada al respecto.
8. Realice una gráfica de población Vs. frecuencias fenotípicas de cada uno de los caracteres estudiados. ¿Cómo cambian los valores de las frecuencias de los caracteres en estudio a medida que se incrementa el tamaño de la población?
9. ¿Qué puede decir del grupo de genética respecto a la muestra de población tomada en la Universidad Nacional?

10. En un caso particular. ¿Cuál es la probabilidad que dos personas tomadas al azar dentro de la Universidad Nacional dominantes para todos los caracteres tengan un hijo de igual fenotipo?
11. ¿Cuál es la probabilidad de que dos personas tomadas al azar dentro de la Universidad Nacional dominantes para todos los caracteres tengan un segundo hijo fenotípicamente recesivo para todos los caracteres?. Tenga en cuenta el concepto de independencia.
12. ¿Cuál es la cantidad de morfotipos que se pueden producir para 10 caracteres de dominancia completa?
13. ¿Cuál es la cantidad de morfotipos que se pueden producir para 10 caracteres codominantes?
14. ¿Cual es la cantidad de morfotipos que se pueden producir para diez sistemas de alelos múltiples? Deduzca una ecuación general.
15. Deduzca la ecuación general para determinar el número de morfotipos que se producen para  $n$  caracteres de diferentes mecanismos de herencia que pueden tener  $n$  alelos.
16. ¿Que podría discutir sobre la variabilidad genética de la naturaleza a la luz de las anteriores conclusiones?

## Bibliografía citada

- Daniel W.** 1997. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Tercera edición. Editorial Limusa. México D. F.
- Gutierrez S.** 1994. Filosofía de la estadística. Servei de publicacions. Universitat de Valencia. Valencia.
- Hartl D.** 1997. Principles of population genetics. Tercera edición. Sinauer associates inc. Sunderland.
- Kuspira J & Walker G.** 1973. Genetics: questions and problems. Primera edición. Mc Graw Hill. México D. F. New York.
- Ospina D.** 2001. Introducción al muestreo. Primera edición. Editorial Unilibros. Bogotá.

- Steel R & Torie J.** 1988. Bioestadística, principios y procedimientos. Segunda edición. Mc Graw Hill. México D. F.
- Strickberger M.** 1985. Genética. Tercera edición. Ediciones Omega S. A. Barcelona.
- Walpole R & Myers P.** 1992. Probabilidad y estadística. Cuarta edición. Mc Graw Hill. México D. F.
- Zar J.** 1996. Biostatistical analysis. Tercera edición. Prentice Hall. New Jersey.

## CAPÍTULO 5

---

### *Prueba de degustación de la FTC*

---

#### Introducción

Compuestos como la fenil-tio-carbamida (FTC), la fenil-tio-urea (FTU) o la 6-n-propyl-tio-uracil (PROP), se caracterizan por tener un radical  $\text{N-C=S}$  en su estructura química, responsable del sabor amargo de los mismos. Se ha comprobado por una serie de experimentos, realizados desde los años treinta hasta la actualidad, que la capacidad de percibir el sabor amargo de dichos compuestos está determinado por un par de genes autosómicos ( $T = \text{perceptor}$  y  $t = \text{no perceptor}$ ), presentes en el cromosoma 5 en humanos (Duffy y Bartoshuk, 1999), así como por una familia de genes responsables de la percepción de los sabores amargos en general (Zuker *et al.* 2000)

El primer registro científico de esta característica, sucedió por azar en el laboratorio de Fox (1932), cuando su colaborador percibió un sabor amargo en el aire y el propio Fox negó percepción alguna de dicho sabor. Este hecho llevó a una investigación más rigurosa por parte de Fox, quién llegó a concluir que en una población normal, un mayor número de personas perciben el sabor amargo del FTC (carácter dominante), y un menor número de personas son insensibles al sabor (carácter recesivo). Investigaciones posteriores descubrieron que en realidad la población se comportaba de manera bimodal con respecto a la percepción de la FTC, clasificando en tres los gustos: los

“no perceptores”, los “super-perceptores” y los “perceptores moderados”; siendo los primeros aquellos que no perciben el sabor de ninguna forma, los super-perceptores, aquellos que perciben el sabor a muy bajas concentraciones y los perceptores moderados, aquellos que a bajas concentraciones no perciben el sabor, pero si a altas concentraciones. (Beiguelman B. 1972)

Muchos experimentos se han derivado de la curiosidad despertada por este particular carácter, los cuales han llevado a descubrir factores muy interesantes relacionados con las pruebas descritas en los años treinta y cuarenta. Actualmente se conoce que la percepción del sabor amargo de la FTC y otros compuestos relacionados, no es un carácter exclusivo en humanos, pues ha sido reportado también para otros primates y roedores (Hall. *et al.* 1975). Se han reportado además variaciones en la proporción de expresión según la raza, la edad, el sexo y la presencia de algunas enfermedades (de tiroides especialmente) (Thomson 1980; Bartoshuk 1999; Zuker *et al.* 2000), así como la relación de la percepción a casos de esquizofrenia y depresión.

Los descubrimientos hasta ahora obtenidos han llevado a plantear hipótesis y proyectos en diversas áreas, para establecer con más exactitud la relación de la percepción de compuestos amargos como la FTC y similares con enfermedades, funcionamiento fisiológico de las papilas gustativas, hábitos alimenticios de las personas y las poblaciones, entre otros. Los investigadores en el área mantienen muchas incertidumbres aún y plantean la necesidad de continuar investigando de manera multidisciplinaria este carácter.

Por su fácil diagnóstico, bajo costo, continua siendo una prueba sencilla que permite seguir un carácter mendeliano, polimórfico, y que al caracterizar las frecuencias de cada uno de los alelos en las poblaciones, permite la comparación de diferentes etnias o grupos (Muñoz - Camacho A, 2002, Aréchiga-y Sánchez M. 2000) Desde el punto de vista docente es también una buena práctica en genética básica o de poblaciones.

## Objetivos

- Entender el comportamiento de la dominancia mendeliana simple para los alelos autosómicos implicados (**T**, **t**), mediante umbrales de degustación de la FTC en una población universitaria
- Comprobar el polimorfismo genético de un carácter mendeliano simple, en una población humana particular.

- Describir claramente la acción génica correspondiente al carácter estudiado.
- Recopilar datos suficientes para analizar cuantitativamente el comportamiento de la población estudiada con respecto al FTC y a algunos alimentos, mediante la realización de una encuesta.
- Analizar, con ayuda de las gráficas, los resultados obtenidos en la práctica.

## Materiales

- Papel filtro impregnado con FTC
- Formatos de encuesta
- Vasos de precipitado
- Copas plásticas
- Diluciones acuosas de FTC
- Agua
- Población a encuestar

## Procedimiento

### Prueba de la capacidad de degustación con papel

De acuerdo con el grupo de muestreo asignado a cada pareja de laboratorio, realice 14 encuestas, según el formato anexo designado como: “*encuesta con solo papel*”.

Las convenciones para *raza* se resumen en la tabla 5.1.



En la pregunta sobre alimentos, en caso de obtener una respuesta negativa (no le gusta), pregunte la razón por la cual le desagrada el sabor de ese alimento, en caso de no obtener una respuesta concreta, plantee como opciones de respuesta: le desagrada porque el sabor es amargo, dulce, salado o sin sabor

Abreviatura	Nombre
I	Indígena
N	Negro
M	Mestizo (distinto de I, N o B)
B	Blanco tipo europeo

**Tabla 5.1** Convenciones por raza.

### Prueba de la capacidad de degustación con diferentes concentraciones en papel

Comience realizando usted y su pareja la prueba con las diferentes diluciones, escriba el número del frasco en el que sintió el sabor, posteriormente llene la encuesta y salga a buscar 3 personas más (distintas a las del laboratorio) para realizarle la encuesta. Con las tres personas siga el mismo procedimiento anterior con el formato marcado “*encuestas con concentraciones y papel*”.

## Cuestionario

1. La mujeres embarazadas presentan un incremento en la capacidad de percepción de sustancias amargas, especialmente en los primeros meses de gestación, mientras que en las mujeres menopáusicas disminuye ésta capacidad. ¿Qué hipótesis plantearía usted a esto?
2. ¿Qué puede discutir sobre penetrancia y expresividad de los alelos implicados en la percepción de la FTC?
3. Analice los pedigrees presentados a continuación y responda las siguientes preguntas:
  - a. Teniendo en cuenta que los símbolos oscuros de la Figura 5.1, equivalen a individuos con fenotipo que percibe el sabor, explique:
    - El Fenotipo de III-9 y III-11
    - Prediga el genotipo de I-1, I-2, I-3 y I-4

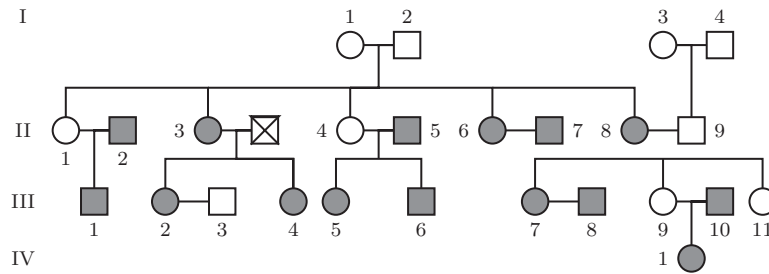


Figura 5.1

b. Teniendo en cuenta que los cuadros rellenos, en la Figura 5.2 equivalen a individuos con fenotipo que percibe el sabor, explique:

- La condición del individuo II-6
- ¿Qué explicación puede dar al fenotipo de los individuos III-3 y III-4?

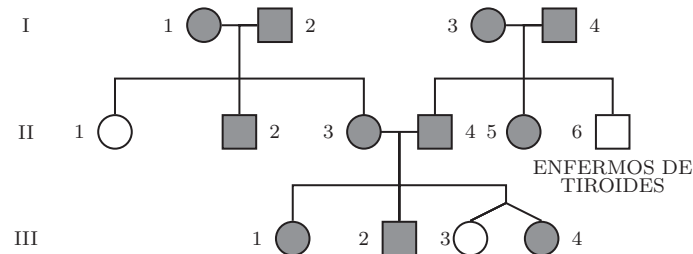


Figura 5.2

4. Asuma que los individuos II-3 y II-4 de la Figura 5.2 no perciben la FTC, ¿Cómo explicaría que tuvieran hijos que percibieran el sabor?
5. ¿Qué otras correlaciones se han hallado entre sensibilidad-insensibilidad a la FTC y enfermedades? Y con alimentos?
6. ¿En que variaría usted la prueba de laboratorio para hacerla más útil y representativa?
7. La capacidad para detectar el sabor amargo de la feniltiocarbamida (PTC) depende de un gen autosómico dominante. En una población

panmítica en equilibrio, de 10.000 personas analizadas, 4.900 fueron incapaces de detectar el sabor amargo de la feniltiocarbamida. Determine las frecuencias alélicas p (para el alelo T) y q (para el alelo t) en esta población. (visitar: [http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/problemas/sol\\_pob\\_20\\_3.htm](http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/problemas/sol_pob_20_3.htm))

## Bibliografía

- Aréchiga–Viramontes J, Mejía Sánchez M.** 2000. Sensibilidad gustativa a la feniltiocarbamida en poblaciones mayas. Estudios de Cultura Maya. Resúmenes. Volumen XXI. pg 1.  
[www.filologicas.unam.mx/revistas](http://www.filologicas.unam.mx/revistas)
- Bartoshuk LM.** 1999. To taste or not to taste. Yale University School of Medicine.
- Beiguelman B.** 1972. Dinamica dos genes nas populações e nas famílias. Edart. Sao Paulo. pp. 82-93
- Duffy VB y Bartoshuk.** 1999. Food acceptance and genetic variation in taste. University of Connecticut.
- Fox AL.** 1932. PNAS 18: 115-120
- Guo S. y Reed D.** 2001. The genetics of phenylthiocarbamide perception. Annals of Human Biology 28(2): 111 - 142.
- Olson JM, Boehnke M, Neiswanger K, Roche AF y Siervogel RM.** 1989. Alternative genetic models for inheritance of the Phenylthiocarbamide taste deficiency. Genetic epidemiology 6:423 - 434
- Thomson JS y Thomson MW.** 1980. Genetics in Medicine. Tercera Edición. W.B. Saunders Company. Philadelphia. pp. 138 - 140.
- Zuker CS, Mueller K, Chandrashekar J, Guo W, Adler E, Hoon M, Ryba y Feng L.** 2000. Bitter-Taste Genes, Insight into taste system. Cell, 3-17-00.

## Anexo

### Encuesta

SEXO: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F		EDAD: _____	RAZA: <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> B
FUMADOR: <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		BEBE CON FRECUENCIA: <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
LE GUSTAN (SI) O NO LE GUSTAN (NO) LOS SIGUIENTES ALIMENTOS:			
ALIMENTO	GUSTO/DISGUSTO	RAZÓN POR LA QUE NO LE GUSTA:	
Brócoli	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
Coliflor	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
Rábano	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
Repollo	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
Berenjena	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
Café (tinto negro)	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
Toronja	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
Espinacas	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
Acelgas	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
PAPEL DE FTC: <input type="checkbox"/> siente sabor? <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO			
DESCRIBA EL SABOR: Amargo <input type="checkbox"/> Insaboro <input type="checkbox"/> Dulce <input type="checkbox"/> Salado <input type="checkbox"/> Picante <input type="checkbox"/>			
HA PROBADO ALGUNA VEZ EL MISMO SABOR: <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO			
CUAL: _____			



## CAPÍTULO 6

---

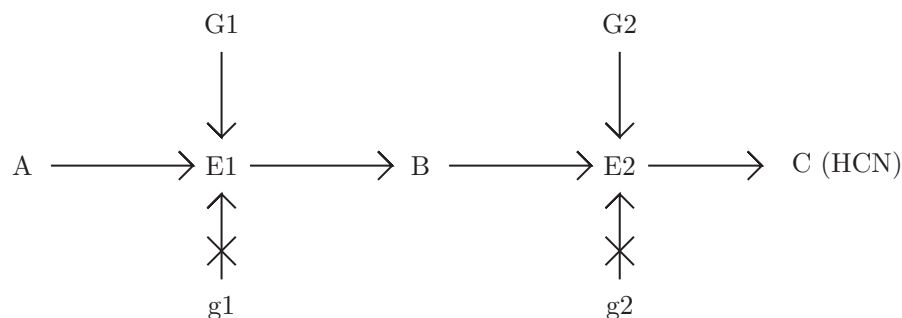
### *Cianogénesis en trébol blanco (*Trifolium repens*)*

---

#### Introducción

En el trébol blanco, la cianogénesis (producción de ácido cianhídrico) está bajo control de dos pares de genes: G1 g1 y G2 g2; G1 g1 controla la producción de una enzima E1, la cual a partir de una molécula precursora, realiza la síntesis de un glucósido, la LINAMARINA y/o la LOTAUSTRALINA. El segundo par G2 g2 controla la producción de una enzima E2, la cual hidroliza al glucósido promoviendo el desprendimiento de HCN. Basta con que uno de los dos pares de genes se hallen en su forma inactiva (homocigótico recesivo) para que no se dé el producto final, es decir HCN (Fig. 6.1).

El caso descrito constituye un buen ejemplo de acción complementaria de genes, es decir, un mecanismo genético en el cual dos genes no alélicos (situados en loci diferentes) intervienen en la producción de un resultado fenotípico determinado. Si las dos formas dihíbridas de plantas de trébol, con relación a los dos loci implicados en la cianogénesis, se cruzan se obtiene la relación típica de 9:3:3:1.



**Figura 6.1** Esquema ilustrativo del mecanismo genético que gobierna la cianogénesis en el trébol. Un precursor molecular A es convertido en glucósido mediante la enzima E1 producida por el gen activo G1. Si está en forma inactiva (g1 g1) se bloquea la reacción y no se produce el glucósido. Una segunda enzima E2, una hidrolasa, producida por un segundo gen activo, G2, promueve el desprendimiento de cianuro. Si este gen está en forma inactiva (g2 g2) no se produce HCN.

## Objetivos

- Determinar la forma de herencia de la cianogénesis en *Trifolium repens*.
- Determinar los fenotipos y genotipos en plantas de *T. repens* mediante las reacciones de coloración.
- Estimar en la práctica cómo actúan dos pares de genes no alélicos que controlan una característica.
- Analizar, a la luz de los resultados, la importancia que presenta esta experimentación.

## Materiales

- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| • Ácido pícrico             | • Bicarbonato de sodio, NaHCO <sub>3</sub> |
| • Esterilizador (autoclave) | • Hojas de trébol                          |
| • Incubadora                | • Papel indicador pH                       |
| • Tiras de papel de filtro  | • Tubos de ensayo                          |
| • Varillas de vidrio        |  |

## Métodos

Los estudiantes se dividirán en parejas o en tríos para realizar el trabajo. El profesor asignará a cada grupo un área de muestreo ubicado dentro del campo de la Universidad.

El muestreo se realizará en la siguiente forma: seleccione 10 plantas que crecen en diferentes puntos de la periferia y el interior del área asignada, según indicaciones del profesor. Cada planta debe estar separada de cualquier otra que se haya seleccionado a una distancia no inferior a 3 metros en círculo con el objeto de no coleccionar repetidas veces muestras de un mismo clon. Observe las condiciones de iluminación y humedad relativa del suelo de las áreas en donde crecen las plantas de trébol. Tome pequeñas muestras de suelo y determine el pH y % de humedad en el laboratorio. Proceda ahora a marcar cada una de las plantas escogidas (1-10) y enseguida coseche 5 hojas bien desarrolladas de cada una de ellas; guarde cuidadosamente cada muestra de 5 hojas en un tubo de ensayo, el cual deberá marcarse en la misma forma que las plantas de las cuales proceden las muestras. Tape el tubo herméticamente.

De regreso al laboratorio proceda en la siguiente forma: destape un tubo de ensayo, rápidamente agregue unas pocas gotas de agua y luego 1 ó 2 gotas de tolueno. Con una varilla de vidrio macere las hojas contra el fondo del tubo. Una vez hecha la maceración inserte una tira delgada de papel con picrato de sodio, de tal forma que el extremo inferior de éste haga contacto con el macerado. Asegure el otro extremo presionándolo con el tapón del tubo. Repita este procedimiento en cada uno de los 10 tubos.

Lleve sus tubos marcados a la incubadora y déjelos a 40°C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo saque los tubos y examine la coloración del papel de filtro en cada uno.

Anote en qué tubos la coloración del papel cambió de amarillo a rojizo. Esta reacción indica que las plantas correspondientes son capaces de desprender HCN enzimáticamente.

Los tubos que no han dado reacción positiva se dejarán en gradillas a temperatura ambiente durante 48 horas. Transcurrido este tiempo examine de nuevo los tubos, anote aquellos en que se observa viraje de color. Estas muestras deben producir el glucósido pero carecen de la hidrolasa que promueve el desprendimiento de HCN. La liberación de éste se hace en forma “espontánea”, no enzimática, y por lo tanto más lenta.

Vuelva al campo y colecciona nuevas muestras de las plantas que reaccio-



naron positivamente. En el laboratorio, agregue aproximadamente 1 ml de agua destilada a cada muestra y mueva las hojas, moderadamente, con la varilla de vidrio. Tape los tubos y llévelos al baño María durante 15 minutos ó a 70-80°C. Deje enfriar, agregue 2 gotas de tolueno a cada tubo y macere enérgicamente. Filtre. Agregue 2-3 gotas de filtrado a cada uno de los tubos que no reaccionaron. Anote los tubos en que se ha observado viraje de color del papel después del tratamiento.

## Cuestionario

1. ¿Cuál es el genotipo de las plantas capaces de desprender HCN enzimáticamente?
2. Indique la reacción química que produce el viraje de color en el papel de filtro indicador.
3. Ponga una reacción que explique que existen plantas que producen el glucósido pero carecen de la hidrolasa que promueve el desprendimiento de HCN.
4. ¿Cómo se explica que haya muestras que no reaccionan positivamente después del último tratamiento descrito en la práctica?
5. Ordene sus observaciones y resultados e inclúyalos en la tabla del apéndice.

## Bibliografía citada

- Wilkinsson HT, Millar RL.** 1978. Cianogenic potential of *Trifolium repens* l. In relation to peper spot caused by *Stemphylium sarciniforme*. Can J. Bot. 56: 2491 - 2496.
- Agseesing JP y Agseesing W.** 1973. Field observations on the cyanogenesis polymorphisms in *T. repens*. Heredity 31 (2): 276-281.
- Daday H.** 1954. Gene frecuences en wild populations of *T. repens*: 2 distribution by altitudes. Heredity 8: 377-384.
- Heppard M.** 1973. Practical genetics. Blackwell scientific publication.
- Stansfield WD.** 1992. Genética. Colección Schaum. Mc Graw Hill-inte-ramericana de México. 574 pgs.

## Apéndice

### Cianogénesis en trébol blanco (*Trifolium repens*)

**1. Preparación del picrato de sodio:** Preparar una solución de ácido pícrico en agua en proporciones: 10 gr, Ac. Pícrico en 780 ml de agua. Neutralizar lentamente con una solución bicarbonato de sodio 0.5 M. Controlar el pH. Si es necesario filtrar. Impregnar tiras delgadas de papel de filtro con la solución. Cuando se hayan secado los papeles deben conservarse en frascos herméticamente cerrados ó en sobres de papel.

### 2. Tabla de resultados

<u>Tubo No.</u>	<u>REACCIÓN</u>			<u>Fenotipo</u>	<u>SUELO</u>	
	<u>Incub.</u>	<u>T° amb.</u>	<u>+ filtr.</u>		<u>%Hum.</u>	<u>rH</u>
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

# de plantas cianogénicas: \_\_\_\_\_ # de plantas acianogénicas: \_\_\_\_\_  
 Total de cianogénicas (en la clase): \_\_\_\_\_ Total de acianogénicas: \_\_\_\_\_  
 Frecuencia de cianogénicas: \_\_\_\_\_ Frecuencia de Acianogénicas: \_\_\_\_\_  
 Frecuencias genotípicas: G1<sup>-</sup>G2<sup>-</sup> \_\_\_\_\_ G1<sup>-</sup>g2g2 \_\_\_\_\_ glglg2g2 \_\_\_\_\_



## CAPÍTULO 7

---

### *Equilibrio de Hardy-Weinberg*

---

#### **Introducción**

El conocimiento de la dinámica de los genes y su comportamiento en las poblaciones es esencial para un buen entendimiento de la genética en general, del mejoramiento genético y de la evolución.

Aunque los principios básicos de la genética de las poblaciones son relativamente simples, su demostración en la práctica es algo demorada en virtud del intervalo de tiempo requerido por las generaciones.

Para resolver este problema, poblaciones panmíticas, es decir, aquellas que se producen por apareamiento al azar, pueden ser simuladas en el laboratorio. Existen varias formas de hacer esa simulación, incluyendo métodos altamente elaborados que exigen el concurso de computadoras. Un esquema de simulación de esas poblaciones al mismo tiempo simple, ilustrativo y muy práctico es el representado por Amand (1971).

#### **Objetivos**

Después de realizada la práctica el estudiante deberá:

- Interpretar claramente los principios sobre el equilibrio de Hardy-Weinberg en las poblaciones.
- Estimar las frecuencias alélicas y cigóticas en las diferentes poblaciones y generaciones.

## Materiales

- Calculadora.
- Bolsas plásticas negras.
- Botones de diferentes colores para cada grupo.

## Métodos

1. Escoja 100 botones, 50 de un color y 50 de otro color y colóquelos en la bolsa; estos botones representan los gametos femeninos y masculinos. Extraiga de la bolsa parejas de botones, los cuales le permitirán construir su población inicial. Tenga en cuenta:
  - (a) Dos botones coloreados del mismo color constituyen un individuo homocigótico  $A_1A_1$ ; dos botones del otro color representan un individuo  $A_2A_2$  y dos botones de diferente color constituyen un individuo heterocigótico  $A_1A_2$ .
  - (b) Luego de cada extracción, anote el resultado en una tabla y regrese los botones a la bolsa.

Realice el anterior procedimiento hasta lograr una población de 64 individuos. A continuación deberá construir estos individuos pegando los botones según los resultados que haya obtenido.

## Ejemplo

Supongamos que la población quedó constituida como aparece en la tabla 7.1.

**Tabla 7.1** Datos iniciales.

GENOTIPOS	$A_1A_1$	$A_1A_2$	$A_2A_2$
No de individuos	32	16	16
Símbolos	D	H	R

2. Determine las frecuencias de esta población:

(a) Frecuencia de  $A_1$ :

$$p = D + \frac{1}{2}H$$

$$p = 0.5 + 0.125$$

$$p = 0.625$$

(b) Frecuencia de  $A_2$ :

$$q = R + \frac{1}{2}H$$

$$q = 0.25 + 0.125$$

$$q = 0.375$$

3. Determine las frecuencias de los individuos en la población en equilibrio de Hardy–Weinberg.

A partir de las frecuencias  $p$  y  $q$ , se obtienen fácilmente las frecuencias de los genotipos, según la fórmula de Hardy–Weinberg:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$A_1A_1 + A_1A_2 + A_2A_2 = 1$$

La tabla 7.2 nos muestra un ejemplo del cálculo de las frecuencias de Hardy–Weinberg.

**Tabla 7.2** Frecuencias genotípicas.

GENOTIPOS	PROPORCIONES		
	Algebraica	Calculada	No de individuos
$A_1A_1$	$p^2$	0.390625	25
$A_1A_2$	$2pq$	0.468750	30
$A_2A_2$	$q^2$	0.140625	9
Total	1.0	1.000000	64

## Prueba de equilibrio mediante Chi cuadrado ( $\chi^2$ )

Compare las frecuencias de distintos genotipos, de las que se dispone de frecuencias observadas y frecuencias esperadas, las composiciones se obtienen fácilmente de la prueba como se indica en la tabla 7.3.

**Tabla 7.3** Comparación entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas en los diferentes genotipos.

Genotipos	No individuos esperados	No individuos observados	Desviaciones
A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	25	32	1.96
A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	30	16	6.53
A <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	9	16	5.44
Total	64	64	13.93

Grados de libertad (g.l.) = 1

Para este caso los grados de libertad se obtienen restando 1 al número de clases fenotípicas.

Una vez se obtienen las frecuencias de los genotipos en función de las frecuencias genéticas de la muestra ( $p = 0.625$   $q = 0.375$ ) y se tienen los grados de libertad, se compara con la tabla chi-cuadrado, encontrándose un valor superior a 6.63 (nivel 1% de probabilidad) siendo, por lo tanto, altamente significativo. Se concluye así que las frecuencias observadas difieren estadísticamente de las frecuencias esperadas por lo tanto la población original no está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Otra forma de verificar si la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg, consiste en calcular la relación  $H/\sqrt{D \times R}$ , que debe ser igual a dos, cuando la población está en equilibrio. Para la población original:

$$\frac{H}{\sqrt{D \times R}} = \frac{0.25}{\sqrt{0.5 \times 0.25}} = \frac{0.25}{0.3535} = 2.00$$

Para la población en equilibrio (valores relativos de las frecuencias esperadas):

$$\frac{H}{\sqrt{D \times R}} = \frac{0.468750}{\sqrt{0.390622 \times 0.14062}} = \frac{0.468750}{0.234375} = 2.00$$

- 4) Efectué apareamientos al azar entre los individuos de la población original para obtener la generación siguiente.

Retire un individuo al azar, y anote su genotipo. Este será el progenitor masculino de un apareamiento. Regrese ese individuo a la

población para que no haya alteración de las frecuencias. Retire otro individuo, anote su genotipo, este será el progenitor femenino que se apareará con el anterior. Regresar ese individuo a la población, de esta manera se hacen 200 extracciones, obteniendo 100 apareamientos. Apropriadamente anote uno por uno todos los apareamientos efectuados, así como las proporciones de los descendientes esperados en cada caso.

- Cualquier pareja de individuos obtenida al azar de la población pueden aparearse.
- Todos los apareamientos son igualmente productivos.
- Cada apareamiento dará una descendencia de 4 individuos según lo esperado por la segregación Mendeliana. Se anotan todos los descendientes, se suman estos y se construye la nueva población con los valores obtenidos anteriormente. La tabla número 7.4 representa estos resultados en una población constituida como se explicó anteriormente.

**Tabla 7.4** Frecuencias de apareamiento realizados al azar, con las respectivas descendencias para obtener la población de la próxima generación.

Apareamientos	Frecuencia de apareamientos		Descendientes por apareamiento			Descendencia total		
	Esperado	Observado	$A_1A_1$	$A_1A_2$	$A_2A_2$	$A_1A_1$	$A_1A_2$	$A_2A_2$
$A_1A_1 \times A_1A_1$	0.250	0.260	4			104		
$A_1A_1 \times A_1A_2$	0.125	0.100	2	2		20	20	
$A_1A_1 \times A_2A_2$	0.125	0.140		4			56	
$A_1A_2 \times A_1A_1$	0.125	0.110	2	2		22	22	
$A_1A_2 \times A_1A_2$	0.0625	0.070	1	2	1	7	14	7
$A_1A_2 \times A_2A_2$	0.0625	0.080		2	2		16	16
$A_2A_2 \times A_1A_1$	0.125	0.120		4			48	
$A_2A_2 \times A_1A_2$	0.0625	0.050		2	2		10	10
$A_2A_2 \times A_2A_2$	0.0625	0.070			4			28
<b>Sumatoria</b>	<b>1</b>	<b>1</b>				<b>153</b>	<b>186</b>	<b>61</b>

Note, que, siendo los apareamientos efectuados al azar sus frecuencias están en función de las frecuencias de los distintos genotipos; así existiendo 32/64 o sea 0.50 individuos  $A_1A_1$  en la población.

La frecuencia esperada del apareamiento  $A_1A_1 \times A_1A_1$  es  $0.50 \times 0.50$  igual a 0.25. Como son 100 apareamientos, se esperan 25 apareamientos de este tipo. De manera semejante se obtienen las frecuencias esperadas de todos



los demás apareamientos.

Compare las proporciones obtenidas en la nueva generación con las proporciones esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

De manera idéntica a lo realizado en el ítem 4.5, compáre las frecuencias esperadas por medio de la prueba de chi-cuadrado, como lo muestra en la tabla 7.5.

**Tabla 7.5** Comparación del número de individuos esperados, en el equilibrio de Hardy-Weinberg, con las frecuencias observadas.

GENOTIPOS	No. de individuos esperados	No. de individuos observados	Desviaciones
$A_1A_1$	156.25	156	0.068
$A_1A_2$	187.50	186	0.012
$A_2A_2$	56.25	61	0.401
Total	400.00	400	0.481

g.l. =1

No existiendo diferencias estadísticas significativas entre las frecuencias observadas y las esperadas, se concluye que la nueva población está en equilibrio de Hardy-Weinberg, se verifica así que la población alcanza el equilibrio en la primera generación.

#### 5) Obtención de la segunda generación.

Organice una nueva población a partir de las frecuencias obtenidas. Proceda de forma idéntica a la efectuada para la primera (ítem 4), analice los resultados, aplique la prueba de chi-cuadrado y anote sus conclusiones.

## Cuestionario

1. Organice una nueva población con otras frecuencias fijadas por usted, calcule las frecuencias genéticas y verifique si la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg.
2. Suponiendo que  $A_1$  es dominante sobre  $A_2$ ; ¿Cuales son las proporciones fenotípicas de las poblaciones en cada uno de los ejercicios anteriores?
3. Bajo el mismo supuesto anterior, calcule la proporción de individuos  $A_2A_2$  que se obtienen en cada tipo de apareamiento en función de los fenotipos paternos.

4. Generalmente se cree que los genes dominantes son más frecuentes que los genes recesivos. ¿Esto es verdad? Discuta.

## Bibliografía citada

**Azevedo JI & Sop da Costa.** 1973. Ejercicios prácticos de genética. Ed. Universidade de Sao Paulo. Brasil. 288 pgs.

**Griffiths A, Gelbard JW, Miller J, Lewontin R.** 2000. Genética moderna. Mc Graw Hill Interamericana de España. 676 pgs.

**Klug WS & Cummings M.** 1999. Conceptos de genética. Quinta edición. Prentice May Iberia. Barcelona. 814 pp.



## CAPÍTULO 8

---

### *Microevolución y selección natural*

---

#### **Introducción**

Charles Darwin y Alfred Russel Wallace desarrollaron la teoría de la selección natural a mediados del siglo XIX, constituyéndose ésta en un concepto fundamental de la biología pues de ella se ha derivado la teoría del cambio evolutivo. La selección natural es definida como la reproducción diferencial de genotipos de varios locus, que se establece en un medio ambiente, es decir que la selección natural está enmarcada, en términos de éxito reproductivo y sobrevivencia de los organismos de una población.

La selección natural actúa siempre que los fenotipos difieren en sus valores adaptativos, los cuales están dados por la tasa de aumento de un genotipo con relación a los otros presentes en la población.

Las fuerzas evolutivas, (mutaciones, deriva génica, endogamia), promueven la variación genética entre las poblaciones pero es la selección natural la encargada de fijar o eliminar dichos cambios, como también el originar taxones diferentes.

De otro lado, dentro de la síntesis evolutiva moderna, muchos especialistas defendieron las tesis de microevolución o gradualismo, los cuales consideran que la acumulación de muchos cambios genéticos (dentro de una especie), pueden explicar adecuadamente los fenómenos macroevolutivos de una población.

## Objetivo

La siguiente actividad permite al estudiante entender los principios de Hardy–Weimberg; simultáneamente permite observar un modelo de evolución a través de la selección natural y las modificaciones de las frecuencias génicas dentro de una población bajo la acción de la selección.

## Descripción del modelo

El modelo trabaja bajo el concepto predador – presa en el cual los estudiantes hacen el papel de depredadores, dotados de diferentes mecanismos y estrategias de captura (cucharas, tenedores, cuchillos, pinzas, goma adherente, y otros), mientras que las presas corresponden a granos de frijol de diferentes colores y tamaños (blanco, rojo, manchados, negros).

## Materiales y procedimiento

Se toman 100 frijoles de cada uno de los diferentes colores y tamaños; se mezclan y dispersan sobre la superficie del hábitat (piso de asfalto y grama). Cuando se imparte la señal los predadores empiezan la captura de las presas observando las siguientes reglas.

1. El profesor da la señal para que los depredadores cacen las presas durante un minuto. Se permite cazar cuantas presas sea posible, sin importar el color y el tamaño pero tomando solamente una cada vez. Las presas van siendo depositadas en un vaso que porta en la boca cada predador y el cual representa su sistema digestivo.
2. Los predadores deben utilizar sus mecanismos de captura para tomar las presas. No pueden recoger las presas directamente con el vaso y este no debe tocar el suelo.
3. A la señal de PARE los estudiantes deben finalizar la captura, cualquier presa en el artefacto de captura y que no haya sido depositada en el vaso debe ser liberada.
4. Cada predador determina el número de presas que capturó; todos los depredadores que utilizan el mismo aparato de captura suman sus datos para introducir el total en la hoja de computador.

5. Se determina el promedio de presas capturadas para cada tipo de mecanismo de captura y aquellos predadores que no capturaron como mínimo el promedio de presas son declarados extintos. Estos estudiantes retornan a la actividad como descendientes de aquellos que capturaron mayor número de presas y se distribuyen proporcionalmente entre las especies de predadores más eficientes. De los totales de cada color de granos capturados se puede observar directamente que la selección natural está ocurriendo, esto es, que debe existir una tendencia natural a que uno de los colores sea mas comúnmente capturado que los otros.
6. A partir del número de granos capturados se determina el número de granos que aún quedan en el ambiente. Asuma que cada una de las presas que aún queda en el medio ambiente se reproducen, entonces separe uno, dos o tres granos de cada color y tamaño por cada uno de los que aun permanecen en el medio ambiente y distribúyalos en el hábitat. Ejemplo: si se capturaron 65 granos de color rojo aún quedan 35 en el ambiente, los cuales se “reproducen” (el modelo ignora otras fuerzas evolutivas), entonces se adiciona 35, 70 o 105 granos rojos antes de la nueva cacería se repite este procedimiento para cada uno de los colores y tamaños de las presas, registrando este nuevo tamaño de la población inicial; se desarrolla otro minuto de cacería y se anota cuidadosamente los datos de cambio de presas y predadores.
7. Cada vez que se posea un mecanismo de captura similar se encarga de informar a los otros estudiantes lo sucedido en su grupo para que todos dispongan de la totalidad de los datos para su análisis y procesamiento.
8. Construya una gráfica en la cual se vea el ascenso de la población con éxito y la disminución de aquellas sin éxito, de tal manera que muestre la selección entre los predadores y la selección entre presas, graficando para cada generación (periodo de cacería) el porcentaje de presas capturadas y el número de sobrevivientes respectivamente.
9. Informe por escrito las interacciones predador – presa y explique por qué algunas criaturas se vuelven más numerosas que otras. Explique como ocurrieron los cambios en las poblaciones y las diferencias génicas encontradas en las poblaciones de predadores y presas cuando estas habitan en diferentes ambientes (piso de asfalto y grama).
10. De acuerdo con las tendencias observadas, estime cuantas generaciones habrán de transcurrir para que solamente exista una especie de predador y una especie de presa.

## Bibliografía citada

**Ayala FJ & Kiger JA.** 1984. Genética moderna. Fondo educativo interamericano. México D. F.

**Griffiths A.** *et al.* 2000. An introduction to genetic analysis. Séptima edición. Freeman and company. New york.

**Puertas MJ.** 1992. Genética, fundamentos y perspectiva. Interamericana. Mc. Graw-Hill.

**Roughgarden J.** 1996. Theory of population genetics and evolutionary ecology. Prentice Hall. New york.

**Strickberger M.** 1985. Genética. Tercera edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona.

Tablas para toma de datos:

		Parentales										
		No. Presas										
Depredador	Iniciales				Capturadas					restantes		
	R	N	B	P	R	N	B	P	<u>x</u>	R	N	B
Tenedor												
Cuchara												
Pinza												
sacaganchos												
Promedio												
		No. inicial depredadores										
Tenedores												
Cuchara												
Pinza												
sacaganchos												



		Filial 1													
		No. Presas													
Depredador	Iniciales				Capturadas					restantes					
	P	R	N	B	P	R	N	B	P	x	R	N	B	P	
Tenedor															
Cuchara															
Pinza															
sacaganchos															
Promedio															
		No. Depredadores 1													
Tenedores															
Cuchara															
Pinza															
sacaganchos															

		Filial 2												
		No. Presas												
Depredador	Iniciales				Capturadas					restantes				
	R	N	B	P	R	N	B	P	x	R	N	B	P	
Tenedor														
Cuchara														
Pinza														
sacaganchos														
Promedio														
		No. Depredadores 2												
Tenedores														
Cuchara														
Pinza														
sacaganchos														

## CAPÍTULO 9

---

### *Subestructura genética de poblaciones*

---

#### **Introducción**

Uno de los principios de mayor importancia dentro de la genética de poblaciones es el principio de Hardy–Weinberg. Este se sustenta sobre una serie de supuestos poblacionales que en ocasiones no se cumplen. El rompimiento de cada uno de estos supuestos define las principales líneas de trabajo dentro de la genética de poblaciones, es decir, causas de no apareamiento al azar, tasas de mutación que no son constantes, tamaño de población reducido que pueden modificar las proporciones alélicas de una población o efectos de deriva. Cada uno de estos procesos indistintamente causará un efecto de subestructura poblacional, por tanto antes de dar inicio al estudio de los fenómenos de cambio en una población es necesario realizar un análisis sobre subestructura.

#### **Definición de subestructura**

Los organismos tienen la tendencia a vivir en agrupaciones dependiendo de sus características biológicas y es sobre estas que se da el efecto de selección a lo largo del tiempo. Las poblaciones son entidades dinámicas en el espacio–

tiempo, una entidad con propiedades específicas, grupos en el que coexisten diferentes generaciones en el mismo momento y con unos límites espaciales no siempre bien definidos, porque están determinados por las características de movilidad de cada especie.

Los fenómenos naturales entonces afectan a los grupos biológicos y una de las primeras manifestaciones de este proceso suele medirse a partir de los tests de subestructura de población.

Los índices de fijación conocidos como test F en honor a Sewall Wright que desarrolló varias versiones de estos (1922, 1965, 1967 y 1978) describen la diferenciación genética al interior de una población. Esta es entendida como la diferencia en frecuencias alélicas dentro de una población. Los procesos de diferenciación genética pueden ser el indicador de que uno de los supuestos en los que se fundamenta la condición de equilibrio no se está cumpliendo.

Esto nos enfrenta a otra característica de las poblaciones en el espacio-tiempo: la organización en estructuras jerárquicas. Por esta entendemos niveles organizacionales que se encuentran anidados unos dentro de otros. Los criterios empleados para la determinación de los niveles de organización son arbitrarios, dependen de las condiciones geográficas, climáticas o de la organización intrínseca de cada conjunto de organismos.

Una de las consecuencias iniciales de los procedimientos de subestructura es la reducción de genotipos heterocigotos dentro de la población respecto a una población que presenta cruzamiento aleatorio, por tanto uno de los alelos de un sistema inicia un proceso de fijación es decir de aumento de frecuencia tendiente a la desaparición de los demás alelos del sistema.

Dentro de una población se definirán tres niveles básicos de subestructura: subpoblación (s), región (r) y el total (t). Entonces los estadísticos de Wright realmente estarían comparando:

Población total respecto a una subpoblación ( $F_{st}$ )

Población total respecto a una región ( $F_{rt}$ )

Regiones respecto a una subpoblación ( $F_{sr}$ ).

Las ecuaciones se fundamentan en los valores de heterocigosidades dentro de cada uno de los niveles jerárquicos de la población. A continuación se describe cada una de las ecuaciones:

$$F_{sr} = \frac{H_r - H_s}{H_r} \quad (9.1)$$

Test  $F$  de comparación entre subpoblación – región

$$F_{rt} = \frac{H_t - H_r}{H_t} \quad (9.2)$$

Test  $F$  de comparación entre región – Total población

$$F_{st} = \frac{H_t - H_s}{H_t} \quad (9.3)$$

Test  $F$  de comparación entre subpoblación – Total población

Por el tipo de ecuación los tests de subestructura son medidas de distancia. En la ecuación No. 9.3 se evalúa la distancia entre una subpoblación respecto al total de la población. Es una medida general para toda la población, evalúa la diferencia entre cualquiera de las subpoblaciones respecto a una medida general de heterocigosidad de la población.

En la última revisión de los tests de subestructura, Wright sugiere la clasificación de la tabla 9.1 para su interpretación:

**Tabla 9.1** Guía para la interpretación de los valores en los tests de subestructura.

Valor de la prueba	Significado
0 - 0.050	Pequeña diferenciación genética
0.051 - 0.150	Moderada diferenciación genética
0.0151 - 0.250	Gran diferenciación genética
0.0251 o superior	Muy grande diferenciación genética

Recientemente los biólogos conservacionistas han fijado su interés en estos valores debido a que son medidas de la variación genética de las poblaciones naturales respecto a poblaciones en cautiverio, información que es valiosa para las estrategias de manejo.

## Objetivos

- Identificar la variación de las poblaciones mediante los tests de subestructura.
- Relacionar los principios mendelianos con los fundamentos de la genética poblacional.

- Realizar una primera identificación de los factores que pueden determinar la ruptura de la condición de equilibrio.

## Procedimiento

En la Figura No 9.1 se puede observar el tablero de la aplicación Test – F. En esta se representa una población dividida en tres regiones y cada una de ellas a su vez subdividida en tres subpoblaciones.

**Poblaciones para simulación**

Región 1	P1	d	r	P2	r	d	d	P3	d
	d			d	r			d	r
	d	r		d	d	d		d	r
Región 2	P4		r	r	P5		r	P6	d
		d			d		r	d	r
	r		r		r	r	r	d	d
Región 3	P7		r		P8		r	P9	d
	r		d		r	d	d	d	d
			r			r		d	d

**Figura 9.1** Cuadrícula para simulación de poblaciones.

Se trabaja a partir de un carácter de dominancia completa. Cada letra representa un individuo. La letra d representa un individuo dominante, y la letra r un individuo recesivo. Sobre esta cuadrícula se podría realizar la simulación de una gran cantidad de poblaciones.

Una vez que se ha puesto un conjunto de individuos la aplicación automáticamente determina los diferentes valores de heterocigosidades. Hs Hr y Ht. Y a su vez los valores de los diferentes tests F. Para la población de la figura No. 9.1 se presenta los siguientes valores:

## Promedios de Heterocigocidad

Promedio de Sub pob		
0.3743531	<b>Hs</b>	
Promedio de Regiones		
0.4151796	<b>Hr</b>	
Promedio Total		
0.4296325	<b>Ht</b>	
Cálculo de los valores F de Wright		
<b>Fsr</b>	<b>Frt</b>	<b>Fst</b>
0.0983	0.0336	0.1287

Figura 9.2 Resultados para la población inicial.

## Primera Parte

Se proponen entonces los siguientes ejercicios:

1. Establezca una población en la que se encuentre igual cantidad de individuos recesivos y dominantes por subpoblación. ¿Cómo es el comportamiento de los valores de heterocigosidades y los valores de los tests F?
2. Simulando un proceso de migración diferencial: Los individuos dominantes de la región 2 pasan a la región 1, los individuos recesivos de la región 2 pasan a la región 3.
3. Simulando un proceso de selección: Poco a poco los individuos recesivos de la región 1 desaparecen quedando solamente individuos dominantes. A su vez en la región 3 los individuos dominantes desaparecen y solo quedan los individuos recesivos.

En cada uno de los ejercicios se debe realizar el registro de cómo cambian los valores de frecuencia, heterocigosidad y del valor en los tests F. Discutir sobre los valores obtenidos en cada ejercicio.

## Segunda Parte

En esta parte es necesario que el estudiante realice movimientos dentro de las regiones y trate de alcanzar los valores extremos de los tests de subestructura

1. Establezca una población en la que los valores de las heterocigosidades alcancen el máximo valor posible. ¿Cómo son estas poblaciones?
2. Dentro de la región No. 1 desplace los individuos dominantes a la subpoblación 1 y los recesivos a la subpoblación 3.
3. Dentro de la región tres realice el movimiento contrario al ejercicio anterior.
4. La región 2 se mantiene estable. Poco o poco en la población 5 van desapareciendo todos los individuos.
5. En cada uno de los ejercicios se debe realizar el registro de cómo cambian los valores de frecuencia, heterocigosidad y del valor en los tests de subestructura.
6. ¿Que relación encuentra con las proporciones de los experimentos mendelianos?

### Tercera Parte

En este momento los estudiantes deben haber alcanzado un dominio sobre la comprensión de lo que sucede con los tests de subestructura en cada tipo de población. Ahora se dan unos valores de test F y ellos deben construir la población.

Construya las siguientes poblaciones: En cada caso, y antes de iniciar plantee la población que usted se imagina, posteriormente verifique con la población encontrada en el ejercicio

7.  $F_{sr}$  similar a  $F_{st}$

$F_{sr}$	$F_{rt}$	$F_{st}$
0,4992	0,0175	<b>0,5079</b>

8.  $F_{rt}$  similar a  $F_{st}$

$F_{sr}$	$F_{rt}$	$F_{st}$
0,0011	0,7131	<b>0,7134</b>

9. Todos los tests = 0 pero con las heterocigosidades aproximadas a 0.3796009

<b>Fsr</b>	<b>Frt</b>	<b>Fst</b>
0,0000	0,0000	<b>0,0000</b>
Promedio de Sub pob.		
0,3796009	<b>Hs</b>	
Promedio de Regiones		
0,3796009	<b>Hr</b>	
Promedio Total		
0,3796009	<b>Ht</b>	

10. Todos los tests = 0 pero con todas las heterocigosidades iguales a 0.5

<b>Fsr</b>	<b>Frt</b>	<b>Fst</b>
0,0000	0,0000	<b>0,0000</b>

11. Los tres valores son diferentes.

<b>Fsr</b>	<b>Frt</b>	<b>Fst</b>
0,0320	0,0511	<b>0,0814</b>

## Discusión general

12. En cada ejercicio se ha planteado una población diferente, esta debe describirse, e interpretarse con los valores de los tests F.
13. Es necesario usar la escala propuesta por Wright para clasificarlas.
14. Interpretar que efectos ambientales pueden causar estos efectos genéticos en poblaciones naturales.

## Bibliografía citada

**Avice J & Hamrick J.** 1996. Conservation genetics. Primera edición. Kluwer Academia Publishers. Boston.



- Gillespie J.** 1998. Population genetics, a concise guide. Primera edición. John Hopkins University Press. Baltimore.
- Griffiths A. *et al.*** 2000. An introduction to genetic analysis. Séptima edición. Freeman and company. New York.
- Hartl D.** 1997. Principles of population genetics. Tercera edición. Sinauer associates inc. Sunderland.
- Landweber L & Dobson A.** 1999. Genetics and the extinction of species. Primera edición. Princeton University Press. New Jersey.
- Ospina D.** 2001. Introducción al muestreo. Primera edición. Editorial Unilibros. Bogotá.

## CAPÍTULO 10

---

### *Aspectos básicos de citogenética humana*

---

#### Introducción

La historia de la citogenética humana es relativamente corta. Fue sólo hasta 1956, que Tjio y Levan reportaron el número correcto de cromosomas en el hombre cultivando células del pulmón fetal. Hasta los últimos años de la década de los 50, las células utilizadas para el análisis cromosómico provenían de tejidos proliferativos (e.g. médula ósea) o células que podrían ser cultivadas *in vitro* usando las técnicas de cultivo de tejidos (e.g. fibroblastos, tejidos embrionarios).

Nowell PC. en 1960, realizó un descubrimiento que revolucionó el análisis cromosómico en el hombre: una sustancia llamada *fitohemaglutinina* extraída del frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*), que al adicionarla a la sangre en un medio rico en nutrientes, estimulaba la división de los linfocitos. De esta manera, fue posible obtener un mayor número de células a partir de una muestra más accesible. Adicionalmente, los tratamientos hipotónicos fueron determinantes en la mejor visualización y conteo de los cromosomas.

Inicialmente los 22 pares de autosomas se clasifican de acuerdo al tamaño y a la posición del centrómero en siete grupos identificados con letras de la **A** a la **G**.

**Grupo A:** Al cual pertenecen los cromosomas más grandes, metacéntricos o submetacéntricos (pares 1-3).

**Grupo B:** Pares 4 y 5, grandes submetacéntricos.

**Grupo C:** Constituido por siete pares cromosómicos (6-12), medianos, con centrómero en posición medial o submedial. Dentro de este grupo se encuentra también el cromosoma X que podría ubicarse entre los cromosomas 7 y 8 por tamaño.

**Grupo D:** En él se localizan los cromosomas acrocéntricos grandes (pares 13, 14 y 15).

**Grupo E:** A él pertenecen los cromosomas 16, 17 y 18, pequeños metacéntricos o submetacéntricos.

**Grupo F:** Dos pares de cromosomas, 19 y 20, pequeños y metacéntricos.

**Grupo G:** Corresponde a dos pares de cromosomas acrocéntricos pequeños, (pares 21 y 22). Por tamaño y morfología, el cromosoma Y corresponde a este grupo.

De esta manera los cromosomas podrían ser ubicados dentro de un grupo, pero la posición dentro del grupo se hacía más o menos tentativamente (Levan *et al.* 1964).

A principios de los setenta, se desarrollaron las técnicas de bandeo que permitieron no sólo la identificación exacta de la totalidad de los pares cromosómicos sino también la detección de la mayoría de las alteraciones estructurales.

Caspersson *et al.* en 1970, encontraron que al teñir con Quinacrina o compuestos relacionados y observar en el microscopio de fluorescencia se produce en cada par cromosómico un patrón específico de bandas brillantes y opacas que llamaron bandas **Q** (QFQ), por la utilización de la Quinacrina.

Arrighi & Hsu en 1971, y Summer, 1972, descubrieron un método específico de bandeamiento que tiñe el área pericentromérica, las constricciones primarias de los cromosomas 1, 9 y 16 y el segmento distal del brazo largo del cromosoma Y. Estas áreas contienen heterocromatina constitutiva y de ahí el nombre de bandas **C** (BCG). Seabright, 1971 publica una técnica basada en la desnaturalización y renaturalización del DNA, que produce un patrón de bandas claras y oscuras que corresponde a los patrones opacos y brillantes de las bandas **Q**. Esta técnica fue llamada bandas **G** por la utilización de Giemsa como colorante (GTG).

Las bandas **R**, descritas por Dutrillaux y Lejeune en 1971, tienen características de tinción opuestas a las bandas **Q** o **G** y por esto reciben el nombre de bandas **R** (de reversa). Tanto las bandas **Q** como las bandas **G**

y **R** permiten un análisis claro y preciso de la morfología de los cromosomas. No obstante las bandas **G** y **R** presentan una ventaja sobre las bandas **Q** al ser preparaciones permanentes y no requerir equipos ópticos y de iluminación especiales. Las bandas **Q** no necesitan maduración ni procedimientos térmicos o enzimáticos y es una herramienta importante en el estudio de segmentos heterocromáticos particularmente en estudios de paternidad, usando como marcador la región heterocromática del cromosoma Y.

Otra técnica selectiva son las bandas **N**, descritas por Matsui y Sasaki en 1973 y Goodpasture y Bloom en 1975. Estas bandas tiñen los tallos y los satélites de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos y son de especial importancia en el estudio de anomalías que incluyen los brazos cortos de estos cromosomas

Los patrones de bandeamiento obtenidos con la banda **Q** se usaron para construir un ideograma humano con el objeto de establecer una nomenclatura unificada de cada uno de los pares cromosómicos. De acuerdo con lo establecido en la Conferencia de París en 1971, (ISCN, 1978), un sitio o segmento de un cromosoma puede ser fácilmente identificado describiendo: el número del cromosoma, el símbolo de brazo (p = brazo corto, q = brazo largo) el número de la región (área localizada entre dos límites adyacentes bien definidos) y el número de la banda. El centrómero se utiliza como punto de referencia para la numeración de las regiones o bandas, de tal manera que para los brazos la numeración se efectúa desde el centrómero hacia el telómero.

Hasta 1973, se empezaron a desarrollar técnicas para obtener cromosomas en estados tempranos de la división celular en los cuales se observan mayor número de bandas y sub-bandas. Estos cromosomas son más alargados entre más temprano sea el estadio de división celular, de tal manera que mientras en metafase tardía (técnicas convencionales de cultivo) se observa un total de 300 bandas por complemento haploide, en metafases medias se observan entre 320 y 554 bandas y en profase tardía cerca de 2000 bandas. Esto demuestra que el número de bandas observadas en metafase resulta de la fusión progresiva de las bandas y sub-bandas de la profase temprana (Dutrillaux & Leujene, 1971)

La aplicación de estos métodos de bandeo y la estandarización de la nomenclatura ha permitido la correcta identificación de las anomalías ocurridas durante la división celular. Las anomalías cromosómicas pueden ser de dos tipos: de número (aneuploidías o poliploidías) o de estructura (translocaciones, inversiones, deleciones).

Las anomalías numéricas se pueden originar:

- a) Por la no disyunción, es decir por la migración de las dos cromátides de un cromosoma (Mitosis o Meiosis II) o de dos cromosomas de un bivalente (Meiosis I) a un mismo polo.
- b) Por un retraso anafásico que ocurre cuando un miembro de un par cromosómico no efectúa la sinapsis y por lo tanto no se une correctamente al huso, por lo que no tiene ningún desplazamiento hacia los polos, quedando por fuera durante la división.

Las anomalías estructurales se producen principalmente durante la reparación de las lesiones cromosómicas inducidas por agentes teratogénicos internos o externos del organismo. Estas variantes cromosómicas anómalas se pueden clasificar en:

- a) Variantes inestables (fragmentos acéntricos) que se pierden en el curso de las divisiones celulares.
- b) Variantes semiestables (cromosomas dicéntricos y anillos) que tienden a fallar en el curso de las divisiones normales, dado que no existe coordinación entre los centrómeros
- c) Variantes estables (deleciones, duplicaciones, inversiones, isocromosomas y translocaciones) que son capaces de pasar inalterados a través de la división celular pero que en muchos casos dan lugar a problemas meióticos, aunque pueden alterar la composición cromosómica de los gametos y en consecuencia a la fertilidad y a la progenie de los portadores.

Los pasos básicos para el análisis de los cromosomas incluyen:

1. Cultivo de las células en un medio con el empleo de mitógeno adecuado.
2. Acumulación de células en metafase ya sea en cultivo (por utilización de colchicina) o en preparaciones directas.
3. Hinchamiento de las células por el tratamiento hipotónico que conduce a un aumento del volumen celular provocada por la entrada de líquido a las células que contribuye a una mejor dispersión de los cromosomas.
4. Una fijación adecuada del material con Carnoy (3 etanol:1 ácido acético glacial) fresco y frío.

5. La dispersión de los cromosomas sobre la lámina limpia, libre de grasa con un método apropiado.

Los cultivos de sangre periférica son en general los mas empleados en las investigaciones citogenéticas para la mayoría de pacientes y, sólo ocasionalmente, cuando hay indicaciones clínicas especiales, se deben efectuar cariotipos a partir de otros tejidos. El más comúnmente usado es la biopsia de piel que raramente presenta un complejo cromosómico diferente al de los linfocitos y por lo tanto es útil cuando se presentan mosaicos.

En condiciones normales los linfocitos circulantes no se dividen espontáneamente en cultivos, pero puede estimularse su división con varias Lectinas entre las cuales podemos anotar la Fitohemaglutinina (PHA), que estimula la fracción de los linfocitos T y es obtenida del frijol común, *Phaseolus vulgaris*; el “Pokeweed mitogen” obtenido de la *Phytolaca americana*; la Concanavalina A, de *Canavalia ensiformis* y la Favina, del haba *Vicia faba*, que muestra excelentes resultados como estimulante de los linfocitos en algunas especies animales.

La técnica de cultivo de linfocitos empleada en la mayoría de los laboratorios es la técnica de Moorhead *et. al.* 1960, comúnmente conocida como el Método de secado al aire.

## Objetivos

- Introducir a los estudiantes en los aspectos básicos de las técnicas de cultivo celular.
- Obtener cromosomas humanos a partir de cultivos de sangre periférica.
- Dar las pautas básicas para el reconocimiento de los cromosomas humanos en el microscopio.
- Se podrán identificar también algunas de las anomalías estructurales y numéricas más frecuentes en humanos.

## Práctica 1

### Procedimiento

En la figura 10.1 se representan los ideogramas para las técnicas de bandas **G** y **R**.

Cada uno de los estudiantes recibirá un juego de 5 metafases las cuales tendrá que recortar y ordenar de acuerdo al patrón.

Debe identificar en cada una de ellas el sexo, número de cromosomas, si corresponde a un cariotipo normal o representa alguna anomalía. En caso de ser un cariotipo anómalo, identifique cual es la característica cromosómica que lo caracteriza e investigue cuales son las características fenotípicas, malformaciones presentes en los portadores y si corresponde a un síndrome genético específico.

Cada estudiante debe presentar un informe con los cariotipos ordenados y una corta investigación de las anomalías encontradas.

## **Práctica 2**

### **Cultivo de linfocitos**

#### **Materiales y métodos**

##### **Material biológico**

- Sangre periférica estéril para cultivo
- Preparaciones microscópicas de linfocitos

##### **Reactivos**

- Heparina en presentación comercial (Liquemine).
- Medios de cultivo RPMI 1040, MEM, o TC 199.(A 1)
- Suero fetal bovino, Fitohemaglutinina, Colchicina o colcemid, (A-4) Solución hipotónica 0.075% de KCl, (A-2), Metanol químicamente puro, Ácido Acético Glacial.

##### **Equipos**

- Incubadora a 38°C
- Centrifuga clínica
- Microscopios

- Autoclave
- Gradillas
- Chupos

### **Vidrieria**

- Láminas
- Laminillas
- Tubos de centrifuga fondo cónico de 15 ml
- Pipetas de 5 ml, 10 ml, 1 ml
- Pipetas Pasteur
- Probeta

## **Procedimiento**

### **Siembra y cultivo de la sangre periférica**

En la cámara estéril:

1. Preparar en un frasco de cultivo de 30 ml la siguiente mezcla:
  - 4 ml de Medio (RPMI, MEM, TC 199) con antibióticos al 2% en una mezcla que contenga 5000 UI de penicilina y 5000 mg de estreptomicina.
  - 1 ml de Suero fetal bovino (SFB), concentración final de 10%.
  - 0.2 ml de fitohemaglutinina P.

Nota: El medio suplementario será suministrado por el profesor.

2. Adicionar al medio 8 gotas de sangre estéril, con anticoagulante (Liquemine, Roche 5.000 UI/ml.)
3. Incubar por 68–70 horas a 37°C.
4. Adicionar 0.1 ml de colchicina en la cámara estéril. Colocar por 15-20 minutos en la incubadora a 37°C.



### Recolección del cultivo

1. Colocar el contenido de un frasco de cultivo en un tubo de centrifuga de fondo cónico, estéril preferiblemente; centrifugar a 1200 r.p.m. durante 10 min.
2. Descartar el sobrenadante.
3. Adicionar 8 ml de solución hipotónica de Cloruro de Potasio (KCl 0.075M), por 10 - 15 minutos a 37°C.
4. Prefijar con 1.5 ml de Carnoy (3 partes de Metanol: 1 de ácido acético). (A-5) Mezclar por inversión del tubo suavemente.
5. Centrifugar a 1200 r.p.m. durante 10 min.
6. Descartar el sobrenadante, resuspender y adicionar 5 - 6 ml de solución fijadora (Carnoy) a presión con una pipeta pasteur, agitando suavemente, hasta deshacer completamente el botón celular. Tiempo de fijación 30 minutos.
7. Centrifugar, descartar el sobrenadante y repetir la fijación como en el paso anterior, por 15 minutos, centrifugar nuevamente a 1200 r.p.m por 10 minutos.
8. Efectuar tres lavados adicionales con Carnoy (3:1), frío y fresco por 10 minutos, centrifugando a 1200 r.p.m. para remplazar el fijador. En el último, resuspender el botón celular en 0.5 ml de Carnoy.
9. Gotear en láminas limpias, mojadas en un baño de hielo hecho con agua destilada, o congeladas (A3). En cada lámina se deben gotear 4 - 5 gotas en diferente lugar para obtener un extendido homogéneo.
10. Dejar secar al aire.

### Coloración

- a.) Coloración clásica con Giemsa (usar láminas bien secas).
- b.) Colorante para una lámina:  
4.8 ml Buffer Giemsa pH= 6.8 (A-7)  
0.2 ml de Colorante Giemsa
- c.) Colorear por 10 minutos. Secar al aire. Montar con Permunt ó entellar, después de tres pasos por Xilol de lavado.

## Análisis del cariotipo

En las láminas preparadas por los estudiantes y en las proporcionadas por el profesor, debe localizar por lo menos 10 metafases sobre las cuales identificará los diferentes grupos de cromosomas (A-G). Mediante el conteo de los cromosomas del grupo C y G, deduzca cual es el sexo.

Selecione la mejor metafase, con poca o nula cantidad de cromosomas cruzados, con buena resolución en la morfología cromosómica. Proceda a dibujar la metafase identificando con un color diferente cada uno de los grupos (e.g. rojo para los A, verde para los B, etc).

En las preparaciones dadas por el profesor, identifique si el cariotipo corresponde a un individuo normal o si se encuentra en él alguna anomalía numérica o estructural. En el caso de detectarla, investigue cual es el síndrome genético que esta relacionado con ella.

## Cuestionario

1. ¿Por qué los cromosomas son más fácilmente visibles en metafase?
2. ¿Qué ocurre en el proceso de obtención de los cromosomas si se omite el paso de la hipotónica?
3. Para examinar los cromosomas se requiere de preparaciones que contengan células con algunas características específicas. Explique que sustancias intervienen para lograr cada una de las características que se anotan a continuación:
  - Muchas células en división y sincronización de cultivos.
  - Índices mitóticos altos.
  - Cromosomas separados.
  - Cromosomas largos y poco condensados.
  - Numerosas células en profase.
  - Metafases limpias sin citoplasma
4. Si en un individuo usted identifica dos linajes celulares en linfocitos uno con 46 cromosomas y otro con 47. ¿Cómo explica usted este hecho?

5. ¿Cuántos cromosomas hay en el grupo C en una mujer normal? ¿En un hombre normal?
6. ¿Cuántos cromosomas hay en el grupo G en una mujer normal? ¿En un hombre normal?
7. Ordene y diagnostique la metafase con bandas G o R dada por el profesor. Investigue las características del síndrome diagnosticado.

## Bibliografía citada

- Arrighi FE, Hsu TC.** 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetic* 10: 81-83.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C.** 1970. Differential binding of alkylating fluocromes in human chromosomes. *Exp. Cell Res.* 60: 315-319.
- Commite On Human Citogenetic Nomenclature.** 1978. An international system for human cytogenetic nomenclature (1978) ISCN (1978). *Cytogenet. Cell Genet.* 21, 309-404.
- Dutrillaux B & Leujene J.** 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 273: 2638-2640.
- Goodpasture C & Bloom SE.** 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Levan A, Fredga K & Sandberg A.** 1964. Nomenclature for centromeric position chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Matsui y Sasaki.** 1973. Differential staining of Nucleolus Organizer in mammalian chromosomes. *Nature* 246: 148-150.
- Moorhead PS, Nowell PC, Melman WJ y Battips DM.** 1960. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 20: 613-616.
- Nowell PC.** 1960. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20: 462-466.

- Seabright M.** 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet* Octubre, 971-972.
- Summer AT.** 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. *Exp Cell. Res.* 75: 304-306.
- Tjio JH & Levan A.** 1956. The chromosome number of man. *Hereditas.* 42: 16.
- Seabright M.** 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 2: 971-972.

## Bibliografía de consulta

- Beiguelman B.** 1982. Citogenética Humana. El Guanabara. Río de Janeiro. 325 pp.
- Frota Pessua O, Guimaraes P y Otto PA.** 1978. Genética Humana. 3a ed. Francisco Alves. Río de Janeiro. 800 pp.
- Rooney DE & Czepkowski BH.** 1986. Human Cytogenetics. A practical Approach. IRL Press. Oxford. USA 240 pp.
- Saez F & Cardozo H.** 1973. Monografías Científicas Biología. Citogenética Básica y Biología de los cromosomas. OEA No. 23.
- Swanson PC, Merz T & Young W.** 1981. Cytogenetics: The chromosome in division, Inherence and Evolution. Prentice Hall. London. 573pp.
- Therman E & Millard S.** 1993. Human chromosomes: structure, behavior and effects. 3a ed. Springer-Verlag. New York. USA. 374 pp.
- Thomson JS & Thomson SL.** 1975. Genética Médica. Salvat. Barcelona. España. 345pp.
- Verna RS & Babu A.** 1989. Human chromosomes: manual of basic techniques. Pergamon Press. New York. USA. 240 pp.
- Popescu P, Dutrillaux B & Hayes H Eds.** 2000. Techniques in Animal Cytogenetics. Heildelberg. New York: Springer-Verlag-INRA editions. 229 pp.

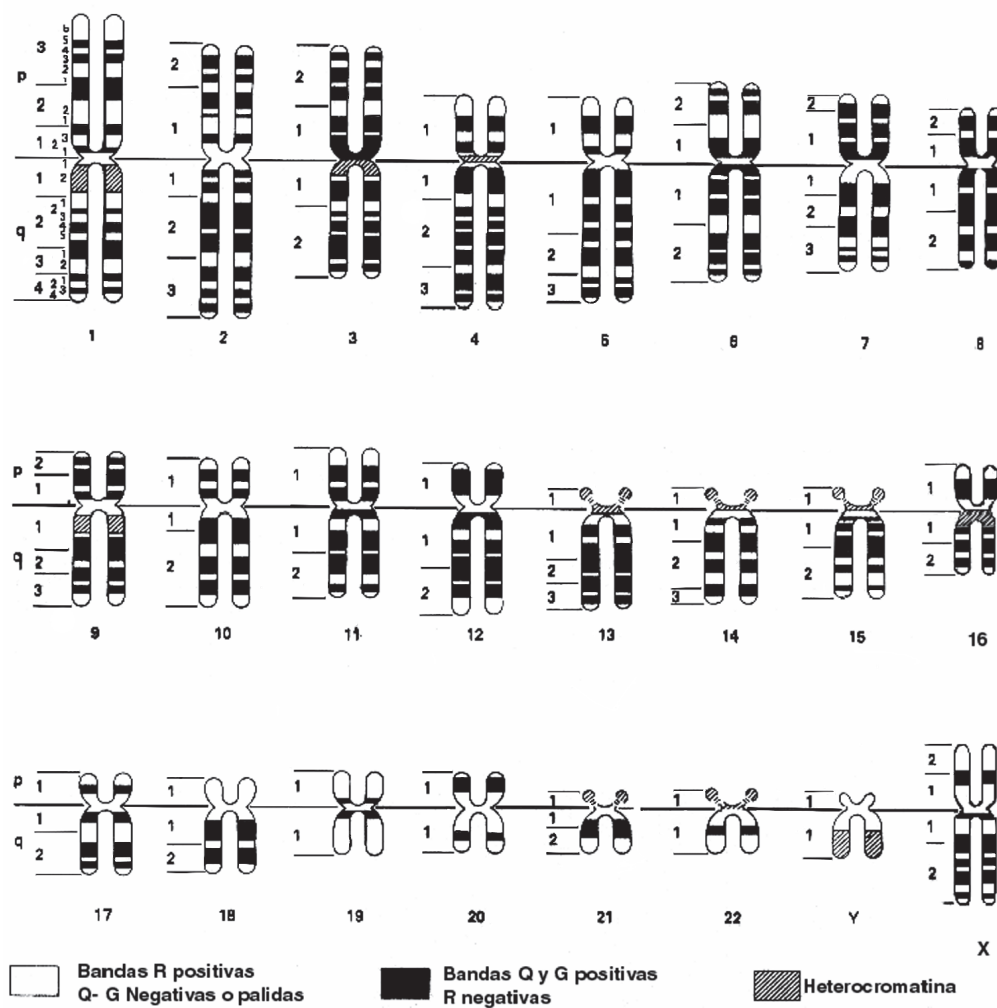


Figura 10.1 Ideograma con bandas del set haploide humano. ISCN (1978).

## CAPÍTULO 11

---

### *Cromosomas politenicos*

---

#### Introducción

Las células de una gran variedad de organismos presentan los llamados cromosomas gigantes o cromosomas politénicos. Estos cromosomas se encuentran en diferentes órganos (glándulas salivales, intestino, recto, túbulos de Malpighi, ovarios, cuerpos grasos) de las larvas, en algunos insectos, principalmente de algunos dípteros como *Anopheles*, *Chironomus*, *Drosophila*, *Rhynchosciara*, *Siara*, Simuliidae, y en varios protozoos y plantas.

Los cromosomas politénicos fueron observados por primera vez por E. G. Balbiani en 1881 en núcleos interfásicos, que no completan la mitosis, por consiguiente los cromosomas se quedan estacionados en interfase, llegando a representar más de 1000 copias de una cromátide en un fenómeno llamado POLITENIA (del griego, *poli* = muchos, *tenos* = filamentos). Cada cromosoma está constituido por un par de homólogos, íntimamente sinapsados, caracterizados por el patrón de bandas originado por la alineación de los diferentes cromómeros a todo lo largo del cromosoma. Los cromosomas politénicos de organismos multicelulares se desarrollan en células que están destinadas a crecer en tamaño, pero no a dividirse. Se forman como resultado de un proceso especializado llamado *endomitosis*, en el que hay aumento del tamaño celular y duplicación del genoma sin división celular.

A lo largo del cromosoma se observa un patrón de bandas oscuras que se alternan con zonas claras llamadas interbandas. Las bandas oscuras se tiñen intensamente y son positivas a la reacción Feulgen; absorbiendo la luz ultravioleta en  $2600\text{\AA}$ . Estas bandas pueden ser consideradas como discos que ocupan todo el diámetro de los cromosomas, hay bandas anchas o estrechas, las más grandes pueden contener una estructura compleja, a veces forman bandas dobles colocadas una al lado de la otra con el mismo espesor y forma; las interbandas tienen un aspecto fibrilar y no colorean con los colorantes básicos, son Feulgen negativas y absorben muy poco la luz ultravioleta. Además presentan mayor elasticidad que las bandas oscuras.

Es notable la constancia en la localización y distribución de los discos o bandas en los dos cromosomas homólogos. Es así muy fácil construir mapas topográficos de las bandas e interbandas y relacionarlos con los mapas genéticos. El patrón de bandas es específico para cada especie lo que permite observar cualquier anomalía de tipo estructural como deleciones, inversiones translocaciones y duplicaciones.

Los cromosomas politénicos se ubican en tejidos que necesitan una muy alta expresión de genes, lo que los hace ser transcripcionalmente activos, por ésta razón se encuentran regiones de configuración especial como son los “puff”, que corresponde a zonas más desenrolladas y de mayor actividad génica. Es posible detectar en estas regiones gran cantidad de RNA mensajero (RNAm). Algunos de estos “puff” son amplificaciones locales de regiones eucromáticas que están amplificadas cientos de veces, en tanto que las regiones heterocromáticas vecinas tienen un número significativamente menor de copias. Por estas evidencias se puede decir que en estos cromosomas existen mecanismos diferenciales de amplificación y son *loci* específicos.

El complemento cromosómico regular de *Drosophila melanogaster* está constituido por tres pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales. La apariencia de los cromosomas en muchas células es así: dos de los autosomas son largos y en forma de V, mientras el tercer par está constituido por cromosomas pequeños y puntiformes. El cromosoma **X** es largo y en forma de bate, mientras que el cromosoma **Y** tiene forma de **J**.

Un aspecto adicional de los cromosomas de glándulas salivales de *D. melanogaster* es la unión de las regiones centroméricas a una región común, llamada *cromocentro*. Del cromocentro se desprenden 5 brazos, como se ilustra en la figura 11.1 El área alrededor del centrómero de cada cromosoma, consiste en material heterocromático lo que constituye el cromocentro. Los cromosomas grandes en forma de V se ligan por su región centromérica

al cromocentro y el cromosoma **X** lo hace por el telómero el cromosoma **Y** es relativamente invisible, confundándose con el cromocentro. La presencia de estos cromocentros es una de las características especie-específicas, por lo que puede servir de marcador cromosómico.

Si uno de los brazos se ve más delgado que los otros cuatro, es probable que se trate de un cromosoma X no apareado (por ejemplo, en un macho), aunque esto puede ser difícil de distinguir. Los *Anophelinos* y *Rhynchosia* poseen cromocentros pero en Simuliidae no existen.

## Objetivos

- Reconocer la estructura de los cromosomas politénicos y sus características.
- Adquirir la capacidad de manipular la información sobre los aspectos básicos de investigación en éste campo.
- Estimar críticamente las posibles causas de error presentadas en el desarrollo de la práctica.
- Ejecutar las disecciones, preparaciones y observaciones en forma correcta.

## Materiales

### Biológicos

Larvas de *Simulium sp* en el cuarto estadio larval, que son reconocidas por el tamaño y la presencia de un histoblasto maduro, de color oscuro, que evidencian la madurez de los filamentos branquiales

Larvas en el tercer estadio de *Drosophila* levantadas con medio enriquecido con levadura.

### Solución para disección

- Solución salina al 0.03% de NaCl.
- Carnoy (3 Metanol: 1 Acido Acético) (A-5)



- Carnoy diluido (1 de carnoy: 19 de agua destilada)
- Ácido Acético al 50%

### **Solución colorante**

1. Disolver 2gr de Orceína sintética en 50 ml de ácido acético glacial caliente.
2. Retirar del fuego y adicionar 50 ml de ácido láctico 85%.
3. Filtrar y guardar.

Al momento de la prueba se diluye en ácido acético al 60%.

### **Instrumentos de laboratorio**

- Pinzas finas
- Pinceles
- Láminas y laminillas
- Estereoscopio.

## **Procedimiento**

### **Colección de larvas en campo**

Las larvas de *Simulium* se localizan donde la corriente del río y la caída del agua son muy fuertes (11.1). Están adheridas sobre piedras, hojas, troncos o plásticos a poca profundidad. Las larvas deben ser fijadas con Carnoy en el campo, y transportadas en frío hasta el laboratorio.

### **Mantenimiento de larvas de Simúlidos en el laboratorio cría de larvas y pupas de Simuliidae en condiciones seminaturales**

La cría de simúlidos es difícil por las exigencias de cada especie. El mantenimiento de larvas en sistemas aireados en laboratorio, permite madurar

larvas que no se encuentran en cuarto o quinto instar para su estudio citogenético, o también es posible levantar pupas y adultos en el laboratorio, a partir de las larvas colectadas en campo, indispensables para la adecuada clasificación taxonómica de las especies.

Las larvas *Simuliidae* necesitan de agua corriente con determinada velocidad, que trae consigo todo el alimento necesario para su desarrollo. El alimento está constituido por residuos orgánicos, bacterias, fito y zooplankton. Para la cría de estos insectos en laboratorio se necesita una bomba de acuario o centrífuga que permita circulación constante del agua, con temperatura estable y remoción de residuos nitrogenados tóxicos resultantes del metabolismo. La alimentación de las larvas es fundamentalmente fitoplancton y puede ser complementada con raciones especiales de concentrado. (Pegoraro R. 1989)

Las larvas deben ser transportadas en frío, preferiblemente con agua de la misma fuente, y si el transporte es prolongado deben venir con aireadores. El agua que se emplea para estos “cultivos”, preferiblemente debe ser traída desde los lugares en donde fue colectado el material.

## Disección Simúlidos

Para la disección de las glándulas salivares (Muñoz de Hoyos 1990, Moreno 1999) en una lámina con unas gotas de fijador diluido, se coloca una larva de último estadio que se reconoce por tener el histoblasto maduro (Fig 11.3a, de color oscuro). Bajo estereoscopio y utilizando dos agujas de disección de punta fina, la larva se abre ventralmente el integumento de la larva con una escisión desde el sexto hasta el noveno segmento abdominal (2/3 partes oostero-ventral del abdomen). Una vez abierta la pared corporal, se localizan fácilmente las glándulas salivares a lado y lado del intestino, (Fig. 11.3b). Estas pueden ser reconocidas como dos bolsas largas en forma de salchicha, recubiertas o rodeadas de cuerpos grasos, que deben retirarse. Se fijan las glándulas con unas gotas de Carnoy por dos o tres minutos. Se retiran las glándulas, a una lámina limpia en la cual se han colocado unas gotas de ácido acético al 50%, se fragmenta el tejido. Adicionar unas 3-4 gotas de orceína lactoacética para colorear las células por 5 minutos. Sobreponer la laminilla y efectuar el esparcimiento del tejido por un simple movimiento de rotación del dedo índice sobre la laminilla, entre dos papeles absorbentes, (toallas de papel).

## Disección *Drosophila*

### Preparación de las larvas

Para garantizar el éxito de esta práctica, las larvas deben ser preparadas especialmente desde su cría. Su desarrollo deberá ser lento guardando los medios de cultivo en sitio con temperatura entre 18 y 19°C. Comenzando con el tercer o cuarto día de vida larval se adiciona diariamente dos goteros de solución de levadura (consistencia de crema). Cuando algunas larvas inician la fase de pupación, las restantes estarán listas para disección. Se seleccionan aquellas más gordas, y de poco movimiento, y son transferidas a una caja de Petri o una lámina para su disección. Si las larvas no van a ser usadas en este momento, los medios se deberán guardar en una nevera para prevenir la pupación. Las larvas maduras pueden permanecer en este estadio por varios días a temperaturas cercanas a los 8°C. (Nates *et al.* 1984)

En *Drosophila* la disección se efectúa en solución salina. En una caja de Petri se seleccionan varias larvas de tercer instar. En una lámina limpia con dos o tres gotas de la solución para disección, se coloca una larva. Bajo estereoscopio, utilizando platina negra y dos agujas de disección se aseguran los extremos de la larva y lentamente se separan, de manera que los ganchos de la boca se desprendan del cuerpo de la larva, conjuntamente con las glándulas salivares. Las glándulas salivares están localizadas anteriormente y pueden ser reconocidas como dos bolsas largas en forma de salchicha, recubiertas o rodeadas de cuerpos grasos, (Fig.11.2) Cuando las glándulas están en su punto para preparaciones cromosómicas pueden verse bulbosas y cristalinas comparadas con las estructuras que le rodean.

Una vez separadas las glándulas se elimina el tejido adiposo que las rodea y se transfieren a una lámina limpia con una gota de solución colorante, donde se dejan 10-15 minutos. Se disocian con ayuda de las agujas de disección y se coloca una laminilla haciendo aplastamiento, ya sea presionando la preparación con el dedo pulgar ó con un borrador de lápiz. El aplastamiento debe realizarse cuantas veces sea necesario hasta tener los cromosomas visibles. Observe las preparaciones en el microscopio primero en pequeño aumento y posteriormente en 40 X.

Determine las siguientes características en las láminas obtenidas:

1. Número de cromosomas.
2. Bandas e interbandas.

3. Brazos cromosómicos.
4. Dibuje e identifique un “puffs”.
5. Localice los centrómeros si están presentes.
6. Longitud del cromosoma.
7. Posición de las regiones organizadoras nucleolares (NOR).
8. Dibuje los telómeros de cada uno de los pares.
9. Identifique algunos de los marcadores más comunes:
  - Anillo de Balbiani
  - Doble burbuja
  - Ampolla
  - Parabalbani
  - Regiones sinápticas

## Cuestionario

1. Dibujar e identificar los cromosomas. ¿Cuántos cromosomas politénicos observa?
2. ¿Cuál será el número diploide de cromosomas del organismo que trabajó?
3. ¿En estas especies, está presente o no el cromocentro?
4. ¿Cuáles son los marcadores cromosómicos más evidentes en estos cromosomas?
5. ¿Investigue como es posible determinar el centrómero en estos cromosomas, hay constricción primaria?
6. ¿Qué es la región organizadora nucleolar? ¿En que cromosoma está localizada?
7. ¿Puede observar asinapsamientos? Represente y localice los asinapsamientos que registre ¿A que serán debidos?

8. Observe los telómeros de todos los cromosomas. ¿Encuentra alguna diferencia en los telómeros de los diferentes pares de cromosomas?
9. ¿Cuales son las principales características que permiten la diferenciación de los cromosomas politénicos?
10. Consulte en la literatura cuales son las aplicaciones de los cromosomas politénicos en sistemática.
11. Si encuentra inversiones heterocigóticas que dan al cromosoma una forma característica, dibújelas.
12. La Onchocercosis es una parasitosis en la cual los simúlidos sirven de vector. Consulte la importancia del estudio de los cromosomas politénicos en estas poblaciones y sus implicaciones en los pronósticos epidemiológicos de la dispersión de los parásitos.

## Bibliografía citada

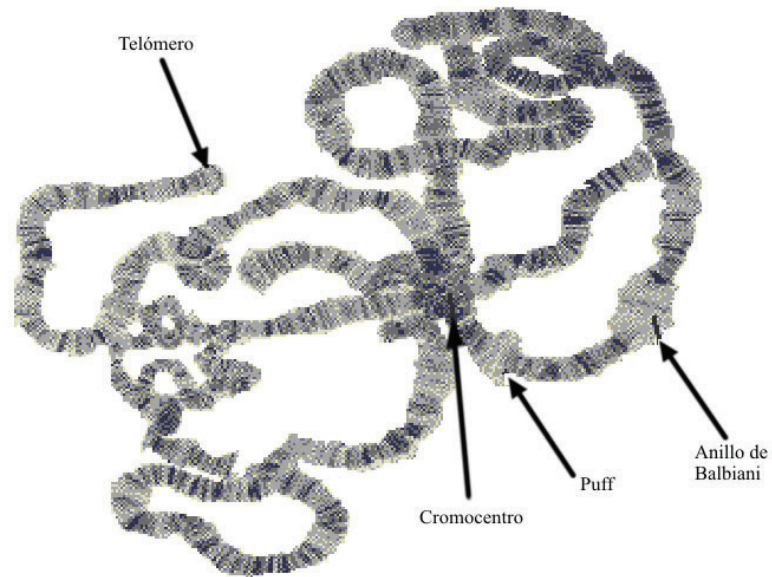
- Barreto PH, Trapido H & Lee VH.** 1971. Oncocercosis en Colombia. Hallazgos entomológicos en el primer foco observado. Acta Médica del Valle 2: 61-64.
- Moreno Ramirez C.** 1999. Los cromosomas politénicos como herramienta para el estudio de especies de la familia Simuliidae. SOCOLEN (Sociedad Colombiana de Entomología). XXVI, 137-146. 6-30. Santafé de Bogotá.
- Muñoz de Hoyos P.** 1990. La importancia de los Cromosomas politénicos en la determinación taxonómica de los Simuliidos. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias exactas, Físicas y Naturales. 17(66), 511-522.
- Nates G, Muñoz de Hoyos & Nuñez F.** 1984. La investigación genética entomológica como instrumento resolutivo de problemas docentes. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 47pp.
- Pegoraro R.** 1989. Dispositivo para Criação de larvas e pupas de Simuliidae (Diptera) em condições semi-naturais. An. Soc. ent. Brasil. 18(supl):179-183

## Bibliografía de consulta

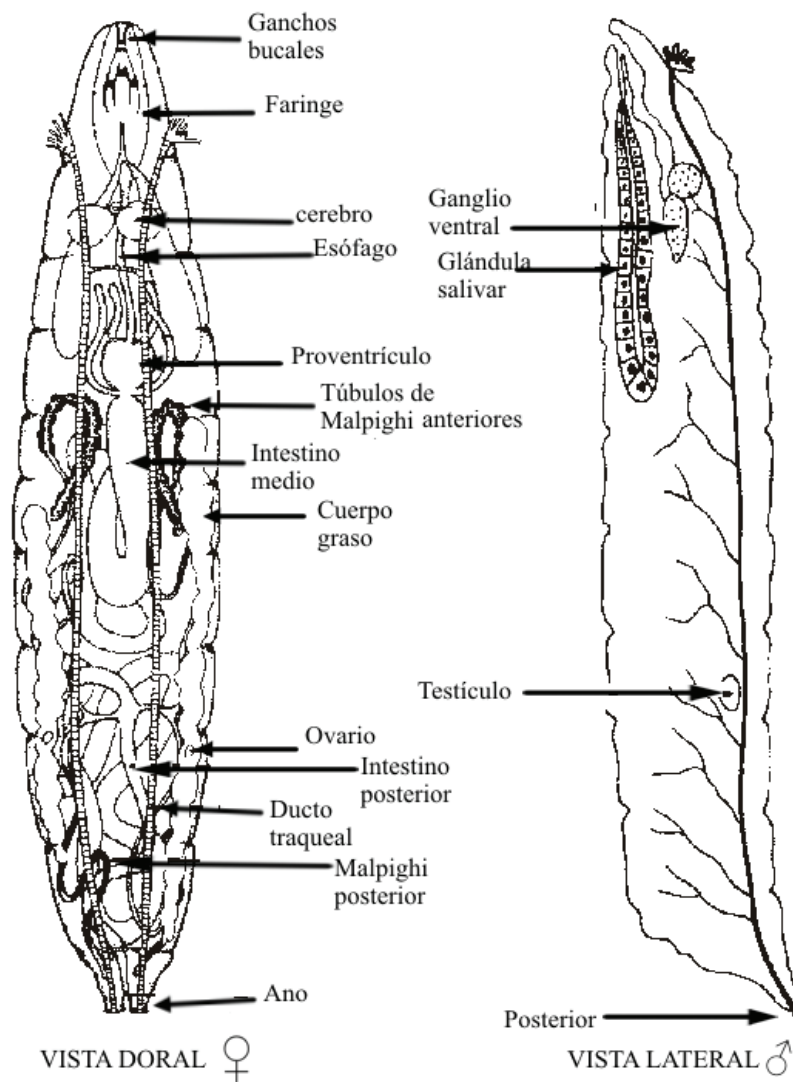
- Arteaga TL & Muñoz de Hoyos P.** 1999. A new cytotype in *Simulium metallicum* complex (Diptera: Simuliidae) from Cundinamarca, Colombia. *Journal Medical Entomol.* 36(2), 133-140.
- Coscarón S & Muñoz de Hoyos P.** 2001. Blackfly novelties from the area near the "páramo de los Valles" in the departament of Tolima, Colombia (Diptera: Simuliidae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales.* 19(74), 587-592.
- Duque S.** 1980. Estudio de *Simulium ignescens* Roubaud, 1906. Bogotá. 102 pp. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.
- Martínez X.** 1991. Taxonomía y anotaciones sobre aspectos biológicos de los *Simulidos* de la región de Chisacá. Trabajo de grado (Biólogo) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.
- Miranda Esquivel DR & Muñoz de Hoyos P.** 2001. A historical perspective to *Simulium (Ectemnaspis)* and *Simulium (Psilopelnia)* limits. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales.* 20(76), 131-140.
- Moreno CH.** 1972. Estudio citogenético de *Simulium (Hemicnetha) muiscorum*, Bueno, Moncada y Muñoz de Hoyos, 1979. Bogotá. 80 pp. Trabajo de grado (Biólogo) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.
- Moreno MC.** 1990. Estudio citogenético de *Gigantodax ortizi Wygodzinsky*, 1973 (Diptera: Simuliidae) de la región de Chisacá. Trabajo de grado (Biólogo) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.
- Muñoz de Hoyos P.** 1996. *Simulium (Grenieriella) sumapazense*. Coscarón & Py-Daniel (Diptera: Simuliidae). Descripción del Adulto y larva. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* 20(76), 141-148.
- Muñoz de Hoyos P & Coscarón S.** 1999. Claves para la identificación de Simúlidos (Diptera: Simuliidae) presentes entre las vertientes Mag-

dalenense y orinocense, en un sector de Colombia. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 23 (Suplemento especial), 181-214.

**Muñoz de Hoyos P.** 2001. Genero *Gigantodax* (Diptera: Simuliidae) en Colombia. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 19(74), 607-630.

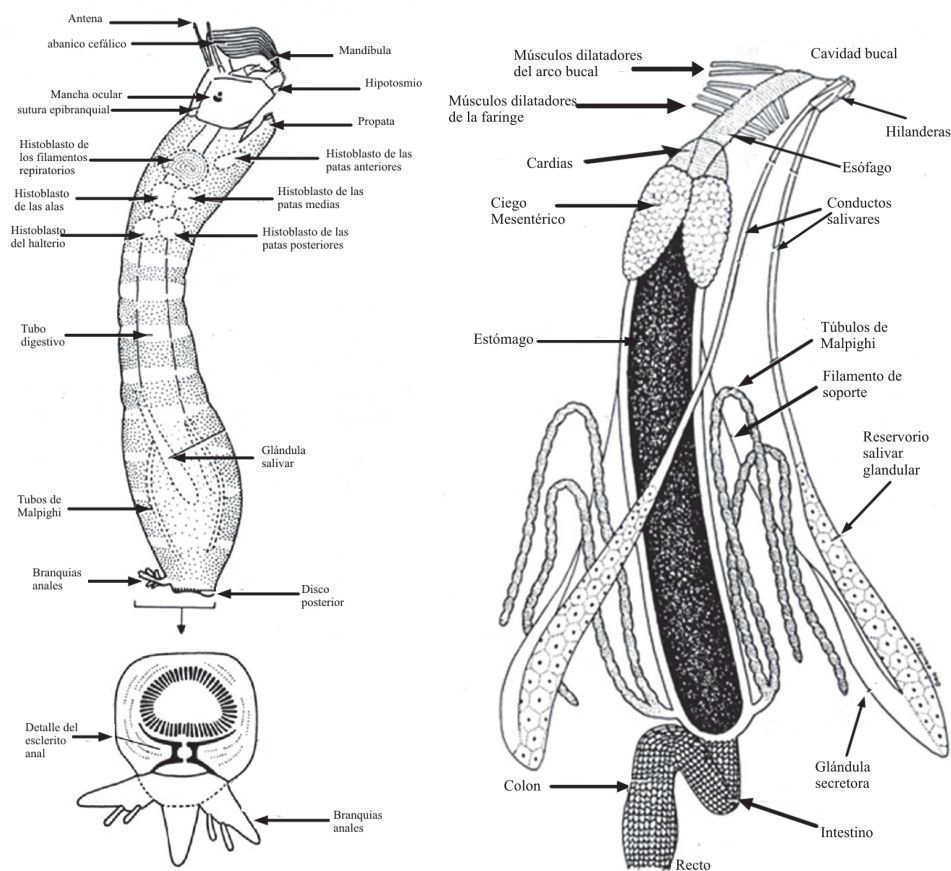


**Figura 11.1** Cromosomas politenicos en *Drosophila*, notar la unión de todos en el cromocentro.



**Figura 11.2** Dibujo esquemático de la larva de *Drosophila* (tercer Instar) (Nates et al 1989).





**Figura 11.3** Esquema de la anatomía en larvas de *Simuliidos*. (adaptado de Barreto et al. 1971)

## CAPÍTULO 12

---

### *Cromosomas mitóticos en médula ósea de **Mus musculus***

---

#### **Introducción**

Para la obtención de cariotipos se han empleado técnicas directas que implican pocas medidas de asepsia, y normalmente se realizan en médula, córnea, epitelio intestinal, punta de la cola en renacuajos, u otros órganos internos como vaso, riñón, e hígado.

Los cultivos cortos o técnicas directas en médula ósea, (Tjio & Whang 1962, Patton 1967) son particularmente útiles en campo y en animales para los que es imposible transportarlos vivos al laboratorio. Han sido muy utilizadas en los estudios citogenéticos de pequeños roedores, murciélagos y en algunas aves.

Estos procedimientos tienen como principal inconveniente, que en la mayoría de los casos es necesario sacrificar el animal que se va a estudiar, ya que solo en animales grandes, con anestesia general y personal especializado es posible hacer la extracción de material de la médula espinal. Por ejemplo son inaplicables a ejemplares silvestres, cautivos en zoológico, ejemplares de zocriaderos destinados a reproducción, en los cuales se requiera de estudios citogenéticos con fines clínicos y/o evaluación de problemas reproductivos.

Tampoco son recomendables para especies silvestres en las cuales cada ejemplar capturado representa un material de incalculable valor por las dificultades que implica una nueva captura.

Estas son las principales razones por las cuales en la citogenética moderna se prefieren las técnicas de cultivos celulares, que se describen para cromosomas humanos en otra guía del presente manual. Los cultivos celulares o de médula (por punción medular), nos permiten hacer varios cultivos sucesivos de un mismo ejemplar, garantizando con ello la obtención de material suficiente para un estudio completo de las especies.

También son útiles en animales de mayor tamaño en los cuales puede ser tomada una muestra de médula espinal o ilíaca sin el sacrificio del animal. Sin embargo, por el riesgo implícito, no siempre resulta ser el procedimiento más recomendado.

Los cromosomas obtenidos por esta técnica son casi siempre muy cortos, de mala consistencia, muy sensibles a los procedimientos de bandas, por lo que se han desarrollado algunas modificaciones en los procedimientos directos que incluyen lavados previos y modificaciones en los procesos de fijación, tendientes a mejorar la calidad de las preparaciones cromosómicas obtenidas de la médula.

## Objetivos

- Mostrar a los estudiantes una serie de técnicas citogenéticas sencillas para la determinación del número cromosómico en ratones. Estas técnicas pueden también ser utilizadas en otros grupos de animales vertebrados desde peces hasta mamíferos.
- Adquirir destrezas y habilidades en el manejo del material biológico y en el montaje de las preparaciones cromosómicas.

## Materiales

### Biológico

- Ratones adultos (*Mus musculus*)

---

## Reactivos

- Suero fetal bovino SFB
- Medio de cultivo con antibióticos (RPMI, MEM o TC 199) (A-1)
- Colchicina 0.05% y colchicina 0.016%. (A-4)
- Solución hipotónica 0.075% de KC (A-2)
- Metanol químicamente puro,
- Ácido Acético Glacial.
- Levadura (A-8 )
- Colorante Giemsa (A-7 )
- Buffer Giemsa (Buffer Sorensen's) pH 6.8 (A-6 )

## Equipos

- Incubadora a 38°C
- Centrifuga clínica
- Microscopios
- Gradillas
- Chupos

## Vidrieria

- Láminas
- Laminillas
- Tubos de centrifuga fondo cónico de 15 ml
- Pipetas de 5 ml, 10 ml, 1 ml
- Pipetas Pasteur
- Probeta

## Procedimiento

### Cromosomas mitóticos de médula ósea

#### Médula con colchicina *in vivo*.

Es una técnica de uso generalizado en todos los animales en los cuales es posible la extracción de médula ósea, bien sea por punción medular, proceso que es posible en algunos mamíferos, aves grandes, o por el sacrificio y extracción de esta de los huesos largos en la mayoría de las especies de menor tamaño.

La actividad mitótica de la médula es muy variable, en ejemplares adultos y en los que han estado en cautiverio por tiempo prolongado o sometidos a estrés, se ha observado una notable disminución en las tasas de división en el tejido medular. Esto lleva a que en algunas ocasiones no se obtenga ninguna metafase, con la imposibilidad de repetir el procedimiento cuando este ha implicado el sacrificio del ejemplar. Retos inmunológicos previos al sacrificio en general mejoran significativamente estos resultados.

#### Estímulo previo de la médula

Cole y Levans (1971) describen una metodología para el estímulo de la médula, en anfibios y reptiles, modificada por Lee y Elder (1980) para pequeños roedores que ha sido empleada con relativo éxito (varia con las especies) en otros grupos zoológicos.

Básicamente esta estimulación se hace mediante la inyección subcutánea abdominal o dorsal de una o dos dosis a intervalos de 24 horas de levadura (Fleischman, activada) (A-8). La aplicación de la colchicina se hace 24 horas después de la última dosis de levadura. La cantidad de levadura inyectada al animal ha sido ajustada en las diferentes especies, en general es proporcional al peso del animal.

El procedimiento descrito por Lee y Elder (1980) conduce a una estímulo de la actividad mitogénica de la médula y es recomendado para animales que llevan largos períodos de cautiverio o que se encuentran en condiciones de estrés que normalmente llevan a una depresión en la actividad medular.

En el apéndice se describe la preparación y activación de la suspensión de levadura

#### Tratamiento con Colchicina

La dosis ideal de colchicina o colcemid tanto en concentración como en tiem-

po de aplicación varía de especie a especie.

Tiempos muy prolongados de colchicina se producen cromosomas excesivamente cortos que no son adecuados para las coloraciones diferenciales. Tiempos cortos en general no permiten la acumulación de suficientes meta-fases.

Dosis elevadas pueden producir la muerte del ejemplar prematuramente. La sensibilidad no es igual en todas las especies y en ocasiones parece depender de las condiciones fisiológicas del ejemplar en estudio.

Algunos autores han encontrado pérdida de la actividad en la colchicina en solución y aún en la liofilizada cuando es conservada por periodos prolongados.

## **A. Preparación directa de médula osea**

### **Procedimiento A: Colchicina *in vivo* (Patton 1967)**

1. Inyectar el animal con una solución de colchicina 0.05%, 0.01 ml por gr de peso, 4-8 horas antes del sacrificio.
2. Sacrificar el animal por paro cardíaco o con un exceso de vapores de cloroformo o éter.
3. Extraer los huesos largos lo mas limpios que sea posible.
4. Cortar las apófisis o perforarlas con una aguja por los dos extremos.
5. La extracción de las células se hace por inyección de solución hipotónica (KCl 0.075 M) precalentada a 37°C, en uno de los extremos del hueso y recolección de está, que arrastra el contenido medular, en el extremo opuesto del hueso dentro de un tubo de centrífuga.
6. Homogeneizar lo más posible la muestra con ayuda de una pipeta pasteur.
7. Incubar con la hipotónica por 15-20 minutos a 37°C.
8. Centrifugar a 1200 r.p.m. por 10 minutos.
9. Descartar el sobrenadante.
10. Resuspender el botón celular.
11. Fijar con Carnoy (3:1 de metanol y ácido acético) fresco y frío.

12. Dejar en fijador las células por 30 minutos. Centrifugar (1200 r.p.m.  $\times$  10 minutos).
13. Descartar el sobrenadante. Resuspender y adicionar fijador fresco por 15 minutos. Repetir los pasos anteriores de centrifugación, eliminación del sobrenadante y fijación.
14. Efectuar un último lavado con Carnoy (3:1), frío y fresco, por 10 minutos, centrifugar, 1200 r.p.m. y descartar el sobrenadante.
15. Resuspender el botón celular en 0.5 ml - 1 ml de Carnoy dependiendo de la celularidad observada.
16. Gotear en láminas limpias, mojadas en un baño de hielo y agua destilada. En cada lámina se deben gotear 3-4 gotas en diferente lugar para obtener un extendido homogéneo. Con médula, la densidad celular es generalmente muy abundante, por lo que se recomienda gotear solo una o dos láminas inicialmente y conservar en fijador en la nevera el resto de células. Las células así conservadas pueden ser goteadas posteriormente, aún meses después, para hacer estudios posteriores. También nos permite estudiar estas primeras láminas y en caso de tener problemas en la fijación, o extensión de las metafases, el frío y el fijador por tiempos prolongados ayudan a mejorar la calidad de las metafases.
17. Dejar secar al aire.
18. Colorear una lámina con Giemsa tradicional, para establecer el cariotipo básico y conservar las otras para las coloraciones diferenciales.

### **Procedimiento B: Colchicina *in vitro***

1. Sacrificar el animal de la misma forma que se describió en el procedimiento anterior u obtener la muestra por punción medular en animales en que esta es posible. La muestra debe ser tomada con todas las condiciones de asepsia posibles para garantizar que esta sea estéril. La extracción del contenido medular se hace con medio de cultivo estéril con penicilina, estreptomicina y sin SFB (Suero Fetal Bovino). Este debe ser previamente precalentado a 37°C.
2. Lavar las células con el medio previamente descrito, dos o tres veces. Los lavados se hacen mediante la suspensión de las células en el medio, con la ayuda de pipetas pasteur estériles.

3. Centrifugar a 1200 r.p.m. por 10 minutos y descartar el sobrenadante. Adicionar de nuevo medio, resuspender y nuevamente centrifugar.
4. Las células así tratadas, después del último lavado son resuspendidas en 15 ml de medio completo, con antibióticos, SFB y 0.3 ml de colchicina 0.016%.
5. Incubar a 37° por 2 horas.
6. Cosechar de la misma forma descrita en el procedimiento anterior.

## Cuestionario

1. ¿Cuántos cromosomas tiene *Mus musculus*?
2. ¿Que morfología presentan estos cromosomas?
3. ¿Observa en sus preparaciones alguna característica que indique fallas en el procedimiento, por ejemplo: Observa citoplasmas? ¿Hay buena dispersión de los cromosomas? ¿Densidad celular? Analice cada uno de estos aspectos y discuta en que paso del procedimiento se pudo haber equivocado y como podría ser modificado par tener preparaciones de óptima calidad.
4. Calcule el índice mitótico de su preparación: número de metafases observadas en 20 campos aleatorios / sobre el número total de células presentes en esos campos.
5. En un corto ensayo presente las aplicaciones de estudios citogenéticos en el conocimiento de las especies.

## Bibliografía citada

- Cole y Levans.** 1971. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improves technique. Herpetology Review 3: T102.
- Gioannoni ML, Gioannoni MA & Ferrai I.** 1986. Citogenética aplicada a aves: Técnicas. Manual Técnico # 1. Univ.Estadual Paulista-UNSP.



- Lee MR & Elder FFB.** 1980. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenet. Cell. Genet.* 26: 36-40.
- Patton JL.** 1967. Chromosome studies of certain pocket mice genus *Perognathus* (Rodentia: Heteromyidae). *J. of Mamml.* 48: 27-37.
- Tjio JH & Whang J.** 1962. Chromosome preparation of bone marrow cell without prior *in vitro* culture or *in vivo* colchicine administration. *Stain Technol.* 37:17-21.

### Bibliografía de consulta

- Klung WS & Commings MC.** 1996. *Essentials of Genetics*. 3 ed. Prentice Hall. New Jersey. 567pp.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts M & Watson JD.** 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3 Ed. Garland Publishing, Inc. New York. 1146pp.
- Curtis H & Barnes N.** 1996. *Invitación a la Biología. Médica Panamericana*. 870 pp.
- Beiguelman B.** 1982. *Citogenética Humana*. El Guanabara. Río de Janeiro. 325 pp.
- Frota Pessua O, Guimaraes P & Otto PA.** 1978. *Genética Humana*. Ed. Francisco Alves. 3a Edición. Río de Janeiro. 800 pp.
- Rooney DE & Czepokowski BH.** 1986. *Human Cytogenetics. A practical Approach*, IRL Press Ltda. Ox.
- Tettenborn U & Gropp A.** 1970. Meiotic nondisjunction in mice and mouse hybrids. *Cytogenetic* 9: 272-283.
- Therman E & Susman M.** 1993. *Human chromosomes: structure, behavior and effects*. 3ª Edición. Springer-Verlag, New York. 376 pp.
- Verna RS & Babu A.** 1989. *Human Chromosomes Manual of Basic Techniques*. Pergamon Press. New York. Oxford. 240 pp.

## CAPÍTULO 13

---

### *Mitosis y meiosis en células vegetales*

---

#### Introducción

Los procesos de división celular son muy importantes en todos los organismos vivos, en los unicelulares es su sistema de reproducción, en tanto que en los organismos multicelulares son la base del crecimiento celular y organogénico, de la reposición de células que están sometidas continuamente a agresiones del ambiente, o de la producción de poblaciones de células especializadas que desarrollarán funciones específicas en estos organismos. Si un organismo quiere continuar viviendo tiene que reponer sus células con una velocidad equivalente a la de la muerte celular.

El proceso de división celular es visible al microscopio y solo es necesario escoger el tejido apropiado. Es importante recordar que no todos los tejidos en los organismos multicelulares tienen tasas de división equivalentes y que muchas células durante la diferenciación pierden la capacidad de división.

El período de tiempo transcurrido entre una división y la siguiente es conocido como *ciclo celular*. Desde 1882 con los primeros trabajos en microscopía, W. Fleming observó las primeras mitosis; posteriormente se evidencio que este mecanismo tiene por función la producción de dos células hijas genéticamente idénticas y la división del citoplasma (Citoquinesis), esta fase

representa solo un pequeño fragmento del tiempo del ciclo celular (entre un 10 - 12%) y ha sido subdividida en varias etapas para facilitar su estudio, pero en realidad no existen puntos específicos de inicio o fin de cada una de ellas.

El tiempo comprendido entre dos mitosis fue llamado *interfase*, pensando que este era un período de reposo de la célula entre división y división. Hoy en día conocemos que más que un período de letargo, en esta fase se llevan a cabo los puntos de chequeo de la división celular, en donde actúan los sistemas reguladores (bloqueadores o inductores) permitiendo o no continuar a la siguiente fase del ciclo.

Las primeras observaciones de la metafase, fueron realizadas a partir de extendidos y cortes histológicos de tejidos en crecimiento como los meristemos, estos estudios proporcionaron información aproximada del número de cromosomas en diferentes especies tanto animales como vegetales. Los números cromosómicos de cultivares, como el arroz, trigo y cebada fueron establecidos desde 1910, en tanto que para los humanos sólo hasta 1956 por Tjio & Levan y Ford & Hamerton, en publicaciones independientes en el mismo año.

La determinación del número, morfología y características propias de los cromosomas, puede constituirse en una importante herramienta en el estudio de una especie y es frecuentemente empleada como un carácter especie específico. En la mayoría de los cultivares, las formas poliploides son más vigorosas y de mayor rendimiento que las haploides o diploides. La certificación del nivel de poliploidía se debe efectuar por conteo cromosómico (Klung & Comming 1996)

En vegetales, se pueden realizar estudios de los cromosomas en meiosis y en mitosis, para el primero se emplean anteras muy jóvenes en las que no se hallan diferenciado las células madre de polen, mientras que los estudios mitóticos se realizan con tejidos diferenciados que presenten tasas de división celular permanentes, estos son los meristemos axiales y apicales. Los meristemos radicales se han presentado siempre como el material óptimo para este tipo de estudio, aún sin ningún pretratamiento. Es con éste tejido que realizaremos la práctica de hoy.

La citogenética vegetal se puede desarrollar mediante el empleo de dos técnicas, una directa en la cual se puede observar las células en cada una de las fases de ciclo celular en un momento determinado y una segunda que comprende cinco etapas: Pretratamiento, fijación, hidrólisis, coloración y *squash*.

Dentro de los *pretratamientos* mas empleados se encuentra la Cochicina, el  $\alpha$ -bromonaftaleno, para-diclorobenceno (PDB) y la 8-hidroxiquinoleina (8-HQ), los cuales permiten la acumulación de células en metafase al inhibir el ensamblaje de los microtúbulos del huso mitótico (Jahier, 1996 ).

La  *fijación* se realiza con soluciones de ácido (acético, propionico o láctico) y alcohol (etanol o metanol) en diferentes proporciones, los más empleados en la citogenética vegetal son:

Carnoy: una solución de etanol y ácido acético en proporciones 3:1 o 3:2

Farmer: solución de etanol, cloroformo y ácido acético en proporciones 6:3:1

FAA: una solución de etanol, folmaldehido y acido acetico en proporciones 14:6:1.

Este proceso finaliza la actividad celular mediante una deshidratación homogénea realizada a bajas temperaturas y mantiene intacta la estructura cromosómica (Fukui & Nakayama 1996). Despues de la fijación se pueden conservar en etanol 70% por algunas semanas.

La *hidrólisis* tiene por objetivo la degradación de la pared celular, esta se lleva a cabo con soluciones ácidas de HCl 1N a 60°C o con soluciones enzimáticas o combinaciones de las dos, lo cual depende de la resistencia que ofrezcan los componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectinas).

Las digestiones enzimáticas de la pared celular se realizan con soluciones de pectidasa, celulasa y macerozima, las cuales digieren las pectinas, la celulosa y la hemicelulosa respectivamente. De esta manera se liberan los núcleos y permiten una observación más nítida de los cromosomas (Moscone 1993)

La *coloración* se realiza con colorantes específicos para los cromosomas, tales como acetocarmin, orceína, Giemsa o Schiff.

Finalmente el *squash* comprende el proceso de montaje de las preparaciones entre lámina y laminilla mediante el aplastamiento firme de las muestras con una varilla de goma. El empleo de estas técnicas favorece ampliamente los estudios citogenéticas de vegetales.

## Objetivos

- Realizar preparaciones (por *squash* o extendido de material digerido con enzimas) del tejido meristemático radical.
- Observar las etapas del ciclo mitótico en las láminas hechas duran-

te el laboratorio y en los micropreparados de cortes de ápice de raíz entregados por el docente.

- Visualizar y reconocer citológicamente todos los eventos (mitóticos y meióticos) tanto a nivel citoplasmático como celular que caracterizan cada una de las etapas de los dos tipos de divisiones.
- Comparar las láminas hechas durante el laboratorio con los micropreparados que se les facilitarán durante la práctica.

## Materiales

### Biológicos

- Mitosis: Bulbos de cebolla a los cuales se les ha inducido el brote de raíces con humedad.
- Meiosis: Capullos florales muy jóvenes de *Lirium* y de *Nicotiana*.

Micropreparados de ápice de la raíz de cebolla y/o de otras plantas tales como trigo, haba, garbanzo, frijol. Cortes de antera de lirio y agapanto

#### Equipo

- Estereoscopio
- Microscopio
- Mechero de alcohol
- Plancha calentadora
- Centrifuga clínica
- Incubadora

#### Vidriería

- Cajas de petri
- Tubos de centrifuga
- Láminas
- Pipetas 1 ml
- Pipetas 5 ml
- Pipetas pasteur

#### Colorantes y reactivos

- HCl 1 N
- Acetocarmín 1%
- Metanol
- Cocktail enzimático de 4% Celulasa 1.5% Pectidasa y 1.5% macerozima
- Ácido acético
- Orceína, Giemsa o Reactivo de Schiff con solución tampón pH 6.4
- Alcohol de mecheros.

#### Otros

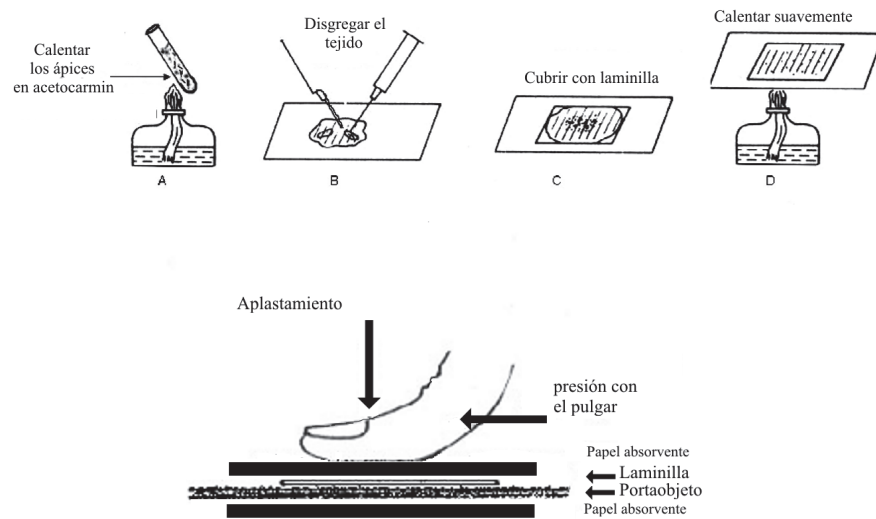
- Toallas de papel
- Papel de filtro
- Cuchillas de bisturí
- Pinzas
- Aguja de disección finas
- Estufa o incubadora precalentada a 37°C

## 1. Mitosis en ápice de *Allium*

De los bulbos que han sido previamente colocados en agua para la inducción de brotes radiculares, seleccione dos o tres ápices en aquellas raicillas que no tengan más de tres centímetros de largo. Las raíces jóvenes presentan tasas de división más altas que las raíces viejas. Las raicillas pueden ser colectadas y prefijadas en Carnoy (3 partes de alcohol: 1 de ácido acético) (A-5), por doce horas en nevera y pasadas a alcohol 70%, en el cual puede ser conservado por varios días en nevera.

### Procedimiento 1.1

1. Coloque los ápices de raíz frescos en un tubo de ensayo que contenga 1 ml de acetocarmín. El acetocarmín funciona como fijador y colorante. (Fig. 13.1)
2. Hierva el tubo con cuidado dos o tres veces.
3. Recupere las raíces vertiendo el contenido del tubo en una caja de petri y con la ayuda de una pinza, colóquela en la lámina sobre una gota de solución de acetocarmín al 1%.
4. Macere el tejido con ayuda de la cuchilla de afeitar y posteriormente coloque la laminilla sobre los fragmentos. Presione de manera firme con una varilla de goma y luego con el pulgar los dos vidrios hasta obtener un extendido homogéneo, evite el desplazamiento de la laminilla.
5. Caliente suavemente la lámina para distender los cromosomas y obtener una diferenciación clara entre citoplasma y cromosomas.
6. Retire con un poco de papel absorbente el exceso de colorante.
7. Observe su preparación en el microscopio. Trate de encontrar y caracterizar las diferentes fases de la mitosis.
8. Establezca la frecuencia de cada una de estas fases contando el número de células por campo en 40X.



**Figura 13.1** Procedimiento de coloración y aplastamiento de ápices de raíz.

### Procedimiento 1.2: Con tratamiento enzimático

1. De raíces jóvenes de no más de 2 cm de largo, corte el extremo terminal (+/- 0.5 cm)
2. Fíjelas en carnoy por dos horas. Posteriormente haga tres enjuagues con agua destilada y déjelas allí por una hora.
3. Sumérjalas en 200  $\mu$ l del cocktail de enzimas en un Eppendorf que debe llevarse al baño de María a 37°C por 30 minutos (este tiempo puede extenderse hasta una hora dependiendo del material empleado).
4. Retire con la pipeta pasteur las enzimas y lave repetidas veces con agua destilada. Deje las raíces en agua por 20 minutos.
5. Con las pinzas finas coloque las raicillas en una lámina bien limpia. Seque el excedente de agua y ponga una gota de fijador fresco (Carnoy: etanol: ácido acético 3:1).
6. Con ayuda de las pinzas, agujas o una cuchilla, triture el material hasta que no queden partículas visibles. Ayude a extender el material con una gota adicional de fijador.

7. Retire el exceso de fijador con papel absorbente, tenga cuidado de no recoger parte del macerado y coloree por 8 minutos con unas pocas gotas de solución de Giemsa (4.8 ml de tampón citrato para Giemsa pH 6.8 y 0.2 ml de colorante recién filtrado).
8. Retire el exceso de colorante con papel absorbente cuidando de no absorber el material y luego coloque una laminilla y realice el *squash* haciendo presión sobre la laminilla con una varilla de goma, evite el deslizamiento de la laminilla sobre la lamina. Observe al microscopio el preparado identificando las diferentes etapas de la mitosis en los diferentes núcleos que encuentre.

## 2. Meiosis en anteras de *Lirium* y *Nicotiana*

La meiosis es un proceso que ocurre en núcleos diferenciados, con el fin primordial de generar células (esporas o gametos) con la mitad de los cromosomas y nuevas combinaciones genéticas en ellos, dos aspectos que han tenido especial significado en el desarrollo de los sistemas de reproducción sexual y en la evolución de los diploides.

La meiosis está constituida por dos divisiones celulares precedidas por solo un ciclo de duplicación cromosómica. Durante la meiosis I, se presenta el apareamiento de los cromosomas homólogos, el entrecruzamiento y la coorientación de los centrómeros de los diferentes pares, originando dos células que contienen la mitad de los cromosomas duplicados. Durante la meiosis II o segunda división, las dos cromátides que han permanecido unidas por los centrómeros se separan migrando cada una a uno de los polos, de forma similar a la mitosis.

En general, las plantas pueden soportar un gran número de mutaciones cromosómicas, poliploidías o hibridaciones con especies relacionadas. El análisis de las configuraciones meióticas resultantes provee informaciones relevantes sobre varios aspectos del comportamiento cromosómico y de sus productos meióticos.

Dado que este es un proceso tejido específico, vamos a emplear en esta práctica las anteras de diferentes fanerógamas. En general, el material seleccionado debe ser muy joven, dado que el proceso meiótico termina muy pronto en la diferenciación del botón floral. Solo es posible observar meiosis en primordios tempranos, en los que la diferenciación no esté avanzada. Si al efectuar las disecciones observamos granos de polen, es necesario descartar el material y buscar anteras de menor tamaño (Jahier 1996).



Las células madres de polen (CMP) presentan procesos continuos de división mitótica y meiótica. Es necesario prestar atención para encontrar diferencias claras que nos permitan saber si los núcleos encontrados corresponden a uno u otro proceso.

### Procedimiento 2.1

Las anteras deben ser colectadas de capullos muy jóvenes de menos de 1 cm de largo. Capullos mayores ya han terminado el proceso de meiosis y solo es posible observar en ellos gránulos de polen maduros o en proceso de maduración.

1. Fije los capullos en Carnoy (etanol: ácido acético 3:1) por lo menos 48 horas antes de la práctica. Resulta conveniente abrir los capullos y fijar solamente las anteras.
2. Con ayuda del estereoscopio, en una gota de ácido acético 45%, haga una disección de las anteras abriéndolas lateralmente para permitir la salida de las CMP que se encuentran en su interior.
3. Coloque una o dos gotas de acetocarmín al 1%. Sobreponga una laminilla presionando firmemente con una varilla de goma.
4. Caliente al mechero sin dejar que se seque ni se hierva el ácido acético. Observe la preparación al microscopio.

### Procedimiento 2.2

Partimos de anteras prefijadas como se describió anteriormente.

1. Coloque las anteras en un tubo con 1 ml de Acetocarmín al 1%. Calentar suavemente dos o tres veces. Retirar las anteras a una lámina limpia.
2. Abra las anteras con la ayuda de una pinza y de las agujas de disección y expulse las células madre del polen (CMP) presionando delicadamente las anteras. Retire el excedente (vainas).
3. Caliente suavemente la lámina sobre el mechero para estimular la penetración del colorante. Después de cinco minutos, cubra la preparación con una laminilla y vuelva a pasar sobre la llama.

4. Observe las preparaciones al microscopio. Verifique las diferentes fases de la meiosis que encuentre. En caso de no encontrar todas las fases, intente nuevamente con anteras más jóvenes.

## Cuestionario

### Mitosis

1. Dé algunos ejemplos de células especializadas en las cuales no se presente división celular en organismos superiores.
2. ¿Cómo actúa la colchicina? ¿Cuál es su estructura química? ¿Que función tiene cuando es empleada como pretratamiento en cultivos celulares o en el crecimiento de las raicillas?
3. De acuerdo con sus observaciones establezca la frecuencia de cada una de las etapas de la mitosis. ¿Cuál de las fases es la más prolongada?
4. ¿Cómo son los cromosomas? ¿Desde que etapa de la mitosis pueden ser visualizados? Dibuje los cromosomas y su entorno celular en cada una de las diferentes etapas de la mitosis
5. ¿Cómo esperaría usted que se comporte un cromosoma sin centrómero durante la mitosis?
6. En algunos insectos se presentan cromosomas holocéntricos (dispersos a todo lo largo del cromosoma) ¿Como será el desplazamiento de estos durante la anafase?

### Meiosis

7. Caracterice los diferentes eventos que caracterizan la profase I.
8. En nosotros, como en los demás animales se producen mitosis y meiosis. ¿Cuál es la finalidad de ambos procesos? ¿En que parte del cuerpo se produce cada una?
9. ¿Cuántos cromosomas se observarán en los espermatozoides de un perro ( $2n = 78$ )? ¿Cuántos en una célula renal? ¿Cuántos bivalentes en cigonema?

10. La falta de disyunción puede aparecer tanto en la primera como en la segunda división meiótica. ¿Cuál sería el resultado (en productos meióticos) de estas anomalías? Incluya dibujos en sus respuestas.
11. Compare la mitosis y la meiosis. Establezca las semejanzas y diferencias en el proceso y en sus consecuencias genéticas.
12. Estudios meióticos pueden ser empleados para la valoración de mutantes, poliploides, híbridos entre especies cercanas. ¿Por qué? ¿Qué información puede derivarse de estos estudios?
13. Consulte la bibliografía y presente un artículo que soporte sus respuestas a la pregunta anterior.

## Bibliografía citada

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts M & Watson JD.** 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3 ed. Garland Publishing, Inc. New York. 1146pp.
- Bowen ID, Bowen SM & Jones AH.** 1998. *Mitosis and Apoptosis: Matters of life and death*. Chapman & Hall. London. 182pp.
- Curtis H & Barnes N.** 1996. *Invitación a la Biología. Médica Panamericana*. 870 pp.
- Easrnshaw WC & Bernat RL.** 1991. Chromosomal passenger: Toward an integrated view of mitosis. *Chromosoma*, 10: 139 - 146.
- Fukui Y & Nakayama S.** 1996. *Plant Chromosomes Laboratory Methods*. CRC Press. Nueva York. 261pp.
- Hyams JS & Brinkley BR.** 1989. *Mitosis, Molecules and Mechanisms*. Academic Press. London. 349pp.
- Jahier J. (Ed).** 1996. *Techniques of plant Cytogenetics*. Science Publishers, Inc. USA. 180 pp.
- Klung WS & Commings MC.** 1996. *Essentials of Genetics*. 3 ed. Prentice Hall. New Jersey. 567pp.

- Moscone.** 1993. Estudios cromosomicos en *Capsicum* (Solanacea) II. Analisis cariotipico de *C. Parvifolium* y *C. annuum* var. *Annuum*. In Kurtziana. 22: 8-18.
- Murray AW & Kirschner MW.** 1991. Control del Ciclo Celular. Investigación y Ciencia. 176: 26-33.
- Murray A & Hunt T.** 1996. The cell cycle: an introduction. Oxford University Press. New York. 251pp.
- Stahl FW.** 1987. Recombinación genética. Investigación y Ciencia. 127: 42-45.
- Tanguy AM.** 1996. Techniques of inducing polyploidy. In: Jahier, J. 1996. Techniques of plant cytogenetics. Science Publishers, Inc. New York. 180 p.
- Tjio JH & Levan A.** 1956. The chromosome number in man. Hereditas. 42:16.

## Bibliografía de consulta

- Ackerman WL.** 1971. Genetic and cytological studies with *Camellia* and related genera technical. b N° 1427. Agricultural Research Service U.S.D.A. p. 79-83.
- Belling J.** 1926. The iron-acetocarmine method of fixing and staining chromosomes. Biology Bulletin. 50: 160-162.
- Chivata C.** 2003. Hibridación y rescate de embriones sexuales in vitro en cruzamientos de *Alstroemeria* sp. × *Bomarea* sp. y estudio citogenético de *Bomarea caldasii*. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Dolezel J, Dolezelova M, Roux N & Van Den Houwe I.** 1995. Nuevo método de preparación de láminas para realizar estudios cromosómicos mediante alta resolución en *Musa* spp. Infomusa 7 (1): 3-4.
- Moscone E.** 1990. Chromosome studies on *Capsicum* (Solanaceae) I. Karyotype analysis in *C. chacoense*. Brittonia 42 (2): 147-154.

- Moscone E, Lambrou M, Hunziker A & Ehrendorfer F.** 1993. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae) Plant Systematics and Evolution. 186: 213-229.
- Rodríguez NC.** 2004. Estudio citogenético en *Physalis peruviana* L. “Uchuva” (Solanaceae). Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Roe K.** 1967. Chromosome size in *Solanum*: Taxonomic and phylogenetics implications. The American Naturalist. 101(919): 295-297.
- Sharma K & Sharma A.** 1980. Chromosome techniques, theory and practice. 3th edition. Butterworths & Co. London.
- Singh R.** 1993. Plant cytogenetics. University of Illinois. Department of Agronomy. CRC Press Inc. USA.
- Talledo C, Escobar C & Alleman V.** 1993. Introducción al análisis cromosómico en vegetales. Lima. Universidad Ricardo Palma. 141p.
- Zanin L & Cangiano M.** 2001. El cariotipo de *Hoffmannseggia glauca* (Fabaceae) Darwiniana 39 (1-2): 11-13.

## CAPÍTULO 14

---

### *Cromosomas metafásicos en *Drosophila**

---

#### Introducción

Para el estudio de cromosomas metafásicos es necesario buscar tejidos que tengan una buena actividad mitótica. En *Drosophila*, el tejido más adecuado es el ganglio neural y el disco imaginal de las larvas de tercer instar (Propescu *et al* 2000). Es conveniente antes de efectuar las disecciones, determinar el sexo de las larvas. Las larvas de *Drosophila* son muy transparentes y en el tercio inferior de larvas maduras, es posible ver las gónadas. Los ovarios son más pequeños que los testículos. (Fig 11.2). En una larva es posible obtener cromosomas mitóticos y politenicos.

En *Drosophila*, como en muchos animales y plantas el incremento de frecuencia de metafases generalmente se obtiene con colchicina (A-4) o colcemid, los cuales son agentes usados comúnmente para inhibir la anafase. Sin embargo, el alto costo y dificultad de conseguir estos reactivos ha motivado a investigadores para buscar otras alternativas, como la levadura de pastelería que ha mostrado ser muy eficiente en el incremento de metafases en larvas de *Drosophila*. Guimaraes y Bicudo (1982) demostraron un incremento hasta de 30.9 veces más en el número de metafases en *D. saltans* y *D. prosaltans*. Hay numerosas técnicas para la observación se los cromosomas neuroblasticos en *Drosophila* (Ashburner 1989, Propescue *et al* 2000)

## Objetivo

- Ejecutar las disecciones, preparaciones y observaciones en forma correcta.
- Reconocer la morfología y número de los cromosomas mitóticos en gánglio cerebral
- Adquirir la capacidad de manipular la información sobre los aspectos básicos de investigación citogenética en *D. melanogaster*.
- Estimar críticamente las posibles causas de error presentadas en el desarrollo de la práctica

## Materiales

### Biológicos

- Cepas silvestres de *Drosophila melanogaster*

### Instrumentos de laboratorio

- Pinzas finas
- Pinceles
- Láminas y laminillas
- Estereoscopio.
- Lámina excavada
- Pipetas pasteur

### Reactivos

- Levadura de pastelería-agua destilada
- Solución Ringer (A-11)
- Solución hipotónica de citrato de sodio al 1%

- Solución fijadora de Carnoy (3 metanol: 1 de Ac. Acético) (A-5)
- Acido Acético al 60%
- Acido láctico 50%
- Lacto-orceína 50%
- Colorante Giemsa (A-7)
- Tapón Giemsa

## Métodos

### Pretratamientos:

1. Seleccionar larvas maduras del tercer estadio levantadas con levadura o pretratadas con un baño en solución de colchicina  $1 \times (A-4.2)$ , en solución tapón isotónica por 30 minutos. (Popescu *et al.* 2000)
2. Colocar la larva en una lámina excavada con unas pocas gotas de una suspensión fresca de levadura (1 g en 10 ml de agua destilada), por 15 a 30 minutos. (Guimaraes & Bicudo, 1982)

### Disección

- Pasar las larvas a una lámina con unas gotas de solución Ringer isotónica (A 11). Hacer disección para retirar el cerebro.
- Transferir el cerebro a una lámina excavada con una gota de solución hipotónica 1% de citrato de sodio por 10-15 minutos para hinchar las células y permitir un mejor esparcimiento de los cromosomas.
- Retirar con papel de filtro el exceso de hipotónica
- Fijar el tejido por 10-15 minutos con Carnoy fresco (1 volumen Acido acético: 3 de Metanol). Cubrir con laminilla. El fijador es muy volátil, no dejar secar. Las láminas se pueden poner sobre hielo o dejar en el refrigerador. Los ganglios pueden procesarse con la técnica de Popescu *et al.* 2000 (A) con secado al aire o hacer un aplastamiento en Orceína lacto acética con la técnica de Guimaraes & Bicudo 1982. (B).



- **A.** Transferir el ganglio cerebral a una lámina limpia con una gota de ácido acético al 60%. Disgregue el tejido con ayuda de las agujas finas. Elimine el exceso de fijador por evaporación, poniendo las láminas en un plato caliente.
- Como forma alternativa, se puede hacer la disgregación del tejido en la lámina excavada y después se transfieren las células con una pipeta pasteur a una lámina limpia y húmeda. Secar al aire. Colorear con Giemsa.
- **B.** Los ganglios previamente fijados se pasan a una lámina limpia con una gota de Orceína lacto acética por 3 minutos.
- Adicionar una gota de ácido láctico 50% por 10 minutos.
- Colocar una laminilla sobre el preparado y cubriendo con papel de filtro hacer presión, con el dedo pulgar, sobre la lámina cuidando de que no se deslice lateralmente la laminilla.
- Observar al microscopio.

## Cuestionario

1. ¿Cuántos y cual es la morfología de los cromosomas metafásicos en *Drosophila*?
2. ¿En que otros tejidos es posible visualizar cromosomas en *Drosophila*?  
¿Qué tipo de cromosomas especiales son particularmente estudiados en estos insectos?
3. Dentro del procedimiento seguido por ustedes cuál es la función del tratamiento con:
  - Colchicina.
  - Acido láctico
  - Metanol: Acido Acético
  - 1% de citrato de sodio
4. Investigue que tipos de cambios cromosómicos están reportados en el genero *Drosophila*. ¿Estas diferencias están en una misma especie?  
¿Marcan algunos de estos cambios diferencias inter específicas o son intra específicos?
5. ¿Qué es un cromocentro? ¿Está dicha estructura presente en los cromosomas mitóticos?

---

## Bibliografía citada

- Ashburner M.** 1989. *Drosophila*, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Azevedo JL & S.O.P. da Costa.** 1973. Exercícios práticos de genética. Editora U. de Sao Paulo. Sao Paulo. Brasil.
- Guimaraes MC & HEM. de C. Bicudo.** 1982. Yeast also increases the frequency of metaphases in *Drosophila* brain. Rev. Bras. Gen. V(2): 433-436.
- Popescu P, Hayes H & Dutrillaux B. (Eds).** 2000. Techniques in animal Cytogenetics. Springer. INRA Editions. Berlin. Heidelberg. Alemania. 229 pp.
- Raw I, Krasilchik M & Cleffi NM.** 1967. Exercícios de citologia-EDART Libraria Editora LTDA. Sao Paulo. Brasil.

## Bibliografia de consulta

- Klung WS & Commings MC.** 1996. Essentials of Genetics. 3 ed. Prentice Hall. New Jersey. 567pp.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts M & Watson JD.** 1994. Molecular Biology of the Cell. 3 ed. Garland Publishing. Inc. New York. 1146pp.
- Curtis H & Barnes N.** 1996. Invitación a la Biología. Médica Panamericana. 870 pp.



## CAPÍTULO 15

---

### *Determinación de la cromatina sexual*

---

#### **Introducción**

La cromatina sexual es un corpúsculo heteropicnótico que se encuentra en los núcleos interfásicos de las células somáticas femeninas de los mamíferos en general. Está formada por uno de los cromosomas X que se duplica tardíamente y es genéticamente inactivo. Murray L. Barr 1908-1995, durante sus observaciones citológicas en cerebros de gatos encontró un dimorfismo sexual entre machos y hembras, describiendo un cuerpo de cromatina sexual que se encontraba en los núcleos neuronales de las hembras pero que estaba ausente en los machos. En un trabajo conjunto con uno de sus estudiantes, E.G. Bertram, publicó sus observaciones (Barr & Bertram 1949). Desde entonces, la cromatina sexual es conocida como Corpúsculo de Barr en honor a sus descubridores. Fue descrita como un gránulo heterocromático, localizado junto a la membrana nuclear, cerca al nucleólo y sólo presente en las hembras.

Este descubrimiento se extendió más tarde al comprobar que en casi todos los mamíferos y en la mayoría de sus tejidos, existía este corpúsculo, por lo que pasó a ser utilizado en el diagnóstico del sexo en mamíferos. Posteriormente su presencia fué confirmada en tejidos femeninos humanos inclusive en los leucocitos polimorfonucleados de sangre periférica donde se le conoce

como “palillo de tambor”. Algunos autores prefieren utilizar el nombre de Elementos Nucleares de Barr, por considerarlo como la expresión biológica más precisa.

Cuando Tjio & Levan demostraron el número correcto de cromosomas humanos en 1956, varias técnicas se desarrollaron para establecer su morfología. En 1959 fueron descritos y correctamente cariotipados varios síndromes cromosómicos como el S. de Down, S. de Turner y S. de Klinefelter. Por los mismos años, básicamente por los esfuerzos realizados por Ohno (1959-1976), acumularon las evidencias de que este cuerpo de cromatina sexual correspondía a uno de los dos cromosomas **X** presentes en las hembras de mamíferos. Esta Inactivación de **X**, ha sido demostrada en casi todas las especies de mamíferos con sistemas de derivación sexual **XX** / **XY** (e.g. Grinberg MA *et al.* 1966 Cromatina sexual en armadillos)

Sin duda, el descubrimiento de la inactivación de uno de los cromosomas **X**, a partir de un centro único de inactivación, tuvo gran importancia en el entendimiento de varias de las anomalías observadas en los cromosomas sexuales sino también significó avances importantes en las enfermedades ligadas al sexo.

En 1961, la Dra Lyon, siguiendo el caso de una mujer negra, que presentó una forma atípica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, planteó la primera hipótesis sobre la inactivación del los **X paterno** o **X materno** en los mamíferos, planteando que estos son una quimera para los productos de los dos cromosomas **X**. (Lyon 1992)

La inactivación del cromosoma **x** es uno de los mecanismos empleados por los mamíferos para la compensación de dosis, la replicación alocíclica del **X** inactiva modifica sus patrones de acetilación de histonas que están implicados en los mecanismos de inactivación génica. (Heard *et al.* 1997)

El cromosoma **X** es muy diferente al cromosoma **Y**, que es uno de los más pequeños de complemento, y es responsable de la diferenciación sexual masculina en los mamíferos.

Muy pocos genes activos han sido localizados en este cromosoma y todos ellos se encuentran en las regiones pseudo autosomales cercanas a los telómeros que son los lugares de reconocimiento del par sexual durante la meiosis.

Los brazos largos del cromosoma **Y** en humanos, contienen cantidades variables de DNAsat, por ser altamente polimorfo, que exhibe una fluorescencia brillante al ser coloreado con Quinacrina.

La composición sexual de un individuo puede ser diagnosticada rápidamente por coloraciones directas de núcleos interfásicos sin tener que recurrir al diagnóstico mediante la elaboración de un cariotipo.

Por la importancia que tiene este elemento en el diagnóstico del sexo cromosómico, su estudio es obligatorio en los laboratorios de Genética Médica. Normalmente en las células masculinas no se encuentra ningún cuerpo de cromatina sexual. En el 20-50% de las células femeninas, de mujeres normales, se aprecia un solo cuerpo de Barr. El número de cuerpos de cromatina sexual es igual el número de cromosomas X menos 1 (Barr & Carr 1961) y por tanto su estudio también es útil en el diagnóstico de aneuploidias sexuales, en las disgenesias gonadales y en los casos de mosaicismo.

En esta práctica se describen algunas de las técnicas para observación de cromatina sexual y que son empleadas en procesos rápidos de determinación del sexo, pueden ser aplicadas a varios tipos de células (cultivos de fibroblastos, bulbos de cabello, espermatozoides) aunque la más usual es la de células escamatorias de epitelio bucales, por su fácil acceso.

La determinación del sexo por estos sistemas pueden tener varios usos además de las aplicaciones clínicas antes mencionadas como la determinación del sexo en las competencias atléticas, que fue establecida por el comité olímpico mundial como obligatoria en los atletas (Dingeon *et al.* 1992, Dingeon B. 1993), predicción del sexo en útero por amiosentesis, para el estudio de cromosomas sexuales (Wälinder J. 2000) o detección de fallas en la inactivación de los X en patologías específicas (Camargo & Wang 1980).

## Objetivos

- Con base en los micropreparados de epitelio, reconocer el cromosoma X inactivo como cuerpo de Barr.
- Diferenciar en las células epiteliales el sexo cromosómico, según ausencia o presencia de los cromosomas X inactivados.
- Familiarizarse con las diferentes coloraciones de microscopía (óptica y de fluorescencia) específicas para demostrar la presencia del Cromosoma X inactivo o la fluorescencia específica del Y en núcleos interfásicos.

## Materiales

### Biológicos

Células epiteliales obtenidas a partir de un raspado de la mucosa bucal.

### Reactivos

- Solución HCl 5 N.
- Carnoy (3 Metanol: 1 Ácido Acético) (A-5)
- Metanol
- Solución acuosa de Cresil violeta al 0.5%(peso/volumen)
- Azul de toluidina 0.1% (peso/volumen)
- Aceto -Orceína 0.2% (A-9 )
- Naranja de acridina 0.1 mg/ml (A-14 )
- Quinacrina 0.5 mg/ml (A-13)
- Tapon McIlvaine pH 5.4 (A-12 )
- Aceite de inmersión

### Instrumentos de laboratorio

- Láminas y laminillas
- Espátula o palillos
- Microscopio

## Procedimiento

Cada uno de los estudiantes tomará dos láminas que serán entregadas al profesor quien asignará un código a cada una de ellas con el fin de efectuar una prueba ciega. Posteriormente se entregaran a cada estudiante, dos láminas codificadas que coloreará y determinará el sexo durante el laboratorio.

## 1. Raspado bucal para extendido

Normalmente la cavidad bucal está densamente poblada de microorganismos, por lo que es indispensable limpiar la parte interna de la mejilla antes de obtener el raspado. Se recomienda por lo tanto efectuar una desinfección del área con una gaza o algodón estéril.

Utilizando la espátula raspar suavemente la cara interna de la mejilla. Dessecar el primer raspado. El segundo raspado se coloca sobre el extremo de una lámina limpia y seca. Con el mismo baja lenguas o con otra lámina extender el material sobre la lámina.

Cada estudiante debe hacer dos extendidos, que serán marcados por el profesor con un código ciego.

## 2. Fijación del material

Las técnicas para la observación de la cromatina sexual han sido derivadas con algunas modificaciones de la técnica propuesta por Klinger y Ludwig 1957.

Popescu *et al.* 2000, recomienda fijar las láminas por 30 minutos en Carnoy (3:1) para visualizar los corpúsculos de Barr, o en metanol absoluto por 15-20 minutos para la tinción de la heterocromatina de Y con Quinacrina (Verna y Babu 1989).

Después de la fijación las láminas con los extendidos son secadas al aire.

Cada estudiante recibirá dos láminas de un compañero no identificado.

## 3. Coloración para microscopia óptica

Para observar las preparaciones de las células epiteliales una de las dos láminas puede ser coloreada por cinco minutos con soluciones acuosas de Cresil violeta 0.5% a 1% (peso/volumen), 0.1% de azul de toluidina o Aceto-orceína 0.2%, colocando 3-4 gotas de colorante sobre la lámina. Es adecuado para preparaciones permanentes pasar por alcoholes y montar con un medio de montaje como Bálsamo de Canadá o Permout.

### 1. Preparación en fresco.

- Colorear las preparaciones con cualquiera de los colorantes anotados en el párrafo anterior.



- Colocar una laminilla y retirar el exceso de colorante con un papel absorbente.
- Examine el extendido en pequeño aumento localizando grupos de células epiteliales. Confirme la presencia o ausencia de la cromatina sexual en inmersión. La cromatina sexual se observa como un pequeño cuerpo denso adherido a la membrana nuclear. Solo es observado en una pequeña fracción (5-30%) de las células femeninas y no es observado en los hombres. (Fig. 15.1).

## 2. Láminas permanentes con coloración con violeta de cresil

- Pase los extendidos por alcohol: 70% y 50%. Cada uno dos minutos.
- Sumerja la lámina en una solución acuosa al 1% de violeta de cresil por 5 minutos.
- Deshidrate en alcohol 95% (dos baños de dos min c/u), alcohol absoluto (dos pasadas rápidas), Xilol (dos pasadas de 5 min)
- Pegar a la lámina una laminilla con una gota de Permount.
- Observar al microscopio.

Para el montaje de cualquiera de las coloraciones acuosas, el procedimiento es similar para hacer láminas permanentes.

Debe efectuarse un recorrido de la lámina observando la presencia o no del corpúsculo de Barr. Determine en las láminas suministradas el % de células que presentan el Cuerpo de Barr. Llene con sus resultados la tabla 15.1, determinando el sexo del individuo problema.

**Tabla 15.1** Tabla de datos para la determinación de sexo en extendidos de células de mucosa oral mucosa

Código de la lámina	# de células (+)	# de células (-)	Total de células observadas	% de células (+)	sexo

## 4. Coloración con naranja de Acridina (Cuerpo de Barr) y Quinacrina (Fluorescencia del Y)

Para confirmar su diagnóstico en el caso de que en su lámina encuentre un buen porcentaje de células positivas, puede colorear la otra lámina con

Naranja de Acridina que en general da una mejor diferenciación del cuerpo de cromatina sexual. Para confirmar la presencia del X inactivo, o con Quinacrina para observar la fluorescencia del Y.

### **Naranja de Acridina (Cuerpo de Barr)**

- Solución de trabajo:  
95 ml de Tapón Sorensen pH 6.8  
5 ml del stock de Naranja de Acridina (1 mg / ml)  
Sumergir las láminas en esta solución por 20 minutos.
- Lavar en agua corriente por 2-3 segundos.
- Lavar en buffer Sorensen's pH 6.8, con una pipeta dejando escurrir varias veces.
- Montar una laminilla con buffer Sorensen's, eliminando el exceso con papel absorbente.
- Mirar en el microscopio de fluorescencia con el filtro adecuado para este fluocromo. Por su observación puede valorar el efecto de las lavadas y si es el caso repetir la coloración. Si la fluorescencia está muy verde, hay exceso de lavado. Recolorear. Si la fluorescencia predominante es roja, no fue suficiente el lavado.

### **Quinacrina (Fluorescencia del Y)**

- Las láminas previamente fijadas con Metanol y secas se colorean con una solución de Quinacrina 0.5 mg/ml por 5-10 minutos en la oscuridad.
- Lavar en agua corriente por 2-3 segundos.
- Montar con Tapón MacIlvaine pH 5.6 eliminando el exceso con papel absorbente
- Mirar en el microscopio de fluorescencia con el filtro adecuado para este fluocromo (450 -500 nm)
- La cromatina del Y exhibe fluorescencia con quinacrina, por lo que se observa un corpúsculo brillante dentro de los núcleos interfásicos. Deben ser observadas por lo menos unas 100 células para emitir un diagnóstico certero.

## Cuestionario

1. ¿Cuál es la importancia del estudio de cromatina sexual?
2. ¿Por qué se inactiva uno de los cromosomas X de las hembras de mamíferos?
3. ¿Qué dice la hipótesis de Lyon?
4. Compare cada una de las técnicas utilizadas en cuanto a su eficiencia en observación de cuerpo de cromatina sexual.
5. ¿En que porcentaje de las células observadas halló cuerpos de Barr?  
¿Hay diferencias en las metodologías utilizadas?
6. ¿La inactivación del X es permanente? ¿Que ocurre con los X inactivos en la meiosis?
7. Cuantos Corpúsculos de Barr puede observar en:
  - (a) Una mujer normal
  - (b) Un paciente con Síndrome de Klinefelter.
  - (c) Un paciente con Síndrome de Turner
8. Investigue cuales son las posibles aplicaciones de este tipo de estudio
  - (a) Para diagnóstico y pronóstico de cánceres (C. de seno)
  - (b) Anomalías estructurales del X.
  - (c) Diagnóstico del sexo en investigación forense.
9. ¿Por que la técnica de fluorescencia del Y es de uso más limitado en estudios de determinación sexual?
10. Investigue los principios básicos en los cuales se basan las dos técnicas de fluorescencia empleadas en la práctica que justifican la especificidad de cada una de ellas para la coloración del los **X** inactivos o los segmentos de heterocromatina distal del brazo largo del Y.
11. Investigue y presente un mapa de los cromosomas **X** y **Y** en humanos, localizando en ellos los principales genes hasta ahora asignados. Como resultado de su investigación presente argumentos para explicar por que en mamíferos aneuploidias XO son viables en tanto que un cariotipo YO no es compatible con la vida.

---

## Bibliografía citada

- Barr ML & Bertram EG.** 1949. A morphological distinction between neurons of the male and the female and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*. 163: 676-677.
- Barr ML, Carr DH.** 1961. Correlation between sex chromatin and sex chromosomes. *Acta Cytol.* 6: 34-45.
- Camargo M & Wang N.** 1980. Cytogenetic evidence for absence of an inactive X chromosome in a human female (XX) breast carcinoma cell line. *Hum. Genet* 55: 81-85.
- Cock AG.** 1964. Dosage compensation and sex-chromatin in non mammals. *Genet. Res. Camb.* 5: 354-365.
- Dingeon B.** 1993. Gender Verification and the Next Olympic Games. To the Editor. *Journal of the American Medical Association* 269(3): 357.
- Dingeon B, Hamon P, Robert M, Schamasch P & Pugeat M.** 1992. Sex Testing at the Olympics. *Nature*. 358: 447.
- Grinberg MA, Sullivan MM & Benirschke K.** 1966. Investigation with tritiated thymidine of the relationship between the sex chromosomes, sex chromatin, and the drumstick in the cells of the female nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*. *Cytogenetics*. 5: 64-74.
- Heard E, Clerc P & Avner P.** 1997. X chromosome inactivation in mammals. *Annu. Review of Genetics*. 31: 571-610.
- Lyon MF.** 1992. Some milestones in the history of X- chromosome inactivation. *Annu. Review of Genetics*. 26: 17-28.
- Ohno S.** 1969. Evolution of sex chromosomes in mammals. *Ann. Review of Genetics*. 3: 495-524.
- Popescu P, Hayes H & Dutrillaux B. (Eds).** 2000. Techniques in animal Cytogenetics. Springer. INRA Editions. 229 pp.
- Tjio JH & Levan A.** 1956. The chromosome number in man. *Hereditas*. 42: 16.

**Verna RS & Babu A.** 1989. Human chromosomes: manual of basic techniques. Pergamon Press. New York. USA. 240 pp.

**Klinger HP & Ludwig KS.** 1957. A universal stain for the sex chromatin body. Stain. Technol. 32: 235.

## Bibliografía recomendada

**Baverstock PR, Adams M & Polkinghorne RW.** 1982. A Sex-Linked Enzyme in Birds - Z-chromosome Conservation but no Dosage Compensation. Nature. 269: 763-766.

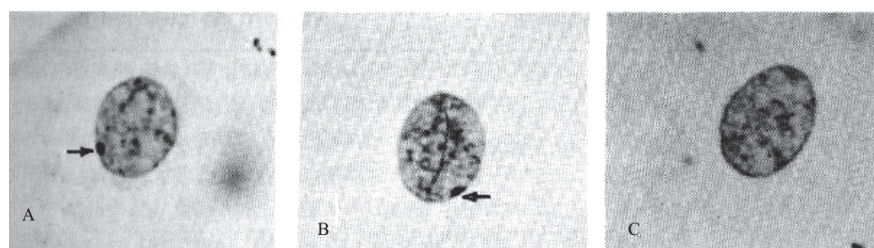
**Ohno S, Kaplan WD & Kinosita R.** 1959. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Ratus norvegicus*. Experimental Cell Research. 18: 451-418.

**Klung WS & Commings MC.** 1996. Essentials of Genetics. 3 ed. Prentice Hall. New Jersey. 567pp.

**Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M., Roberts M & Watson JD.** 1994. Molecular Biology of the Cell.3 ed. Garland Publishing Inc. New York. 1146pp.

**Curtis H & Barnes N.** 1996. Invitación a la Biología. Médica Panamericana. 870 pp.

**Wälinder J.** 2000. Trans sexualism A Study of Forty-Three Cases. <http://www.symposion.com/ijt/walinder/study17.htm>.



**Figura 15.1** A y B células femeninas. Las flechas indican la presencia del Corpúsculo de Barr. C, una célula negativa.

## CAPÍTULO 16

---

### *Meiosis en testículo de ratón*

---

#### Introducción

Los estudios meióticos son importantes, en la definición de las modalidades de apareamiento y segregación de los homólogos en individuos que presenten problemas de fertilidad, en la evaluación de híbridos (Tettenborn & Gropp 1970) o en portadores de alteraciones cromosómicas que pueden implicar fallas en la segregación.

En hembras, los estudios meióticos presentan dificultad debido a la posición interna de los ovarios y porque en éstas, se desarrolla la primera fase meiótica en estado embrionario. Estos estudios resultan mucho más fáciles en fragmentos de testículos obtenidos en biopsias testiculares, que pueden ser procesadas tanto en cultivos o en forma directa. (Evans *et al.* 1964, 1972)

En la meiosis I, los cromosomas parentales están constituidos por dos cromátidas hermanas idénticas. Durante la profase I, los cromosomas homólogos se aparean en el zigotene mediante una compleja estructura proteínica llamada complejo sinaptonémico (CS). El reconocimiento de los homólogos se efectúa punto a punto. En la mayoría de las especies por los telómeros. Si no hay homología entre los cromosomas el complejo se disuelve. El CS está

involucrado no sólo en el reconocimiento de los homólogos sino también en el mecanismo de entrecruzamiento. La recombinación es un proceso clave en el mantenimiento de la diversidad genética, fundamental en los mecanismos adaptativos que permiten la evolución de las especies ante los cambios continuos del medio ambiente.

La recombinación por lo tanto, proporciona en cierta forma el sustrato para la selección natural creando continuamente nuevas combinaciones genéticas en las poblaciones.

Al finalizar la meiosis I cada par homólogo es segregado a las células hijas, cada una contiene entonces un homólogo, constituido por dos cromátidas hermanas. El apareamiento entre homólogos durante la **Meiosis I** después de la replicación del DNA, es uno de los puntos determinantes en la segregación meiótica y permite la recombinación entre los cromosomas paternos y maternos del individuo que realiza la Meiosis. **La meiosis I** es seguida por otra ronda de división, muy similar a una mitosis en las cuales las cromátidas hermanas se separan y segregan a las células hijas. Por lo tanto al final de la **meiosis II**, se forman cuatro células hijas cada una con un complemento haploide, es decir, un solo elemento de cada par de homólogos.

Numerosos estudios en humanos, bovinos y particularmente en ratones de laboratorio han demostrado que la meiosis en individuos portadores de anomalías cromosómicas, particularmente inversiones, deleciones, translocaciones no balanceadas, tienen severos efectos en la viabilidad de los gametos en los cuales se encuentran incrementadas las frecuencias de gametos desbalanceados, nulos, disómicos, fragmentos acéntricos, rupturas aleatorias, cromosomas en anillo, lo que se ve reflejado en la baja significativa de la fertilidad en estos individuos. Sin duda estudios meióticos son una gran ayuda en programas de reproducción ex - situ de animales silvestres.

Los procesos de especiación con rearrreglos cromosómico, involucran sin duda procedimientos de aislamiento reproductivo originado por la inestabilidad cromosómica meiótica del híbrido. Es de esperarse que entre mayor sea el número de cambios cromosómicos entre dos especies, el aislamiento reproductivo sea más efectivo. Adicionalmente, la evaluación cromosómica es importante como dato básico antes de iniciar programas de cría de especies silvestres en cautiverio cuando se establece que esta es la única vía de incrementar el tamaño poblacional o para repoblar áreas particulares. Si no se efectuara esta evaluación, los programas de reproducción pueden llegar al fracaso, al intentar cruzar dos subespecies cariologicamente incompatibles o al emplear como reproductor (macho dominante) un ejemplar portador de una translocación balanceada, fenotípicamente no detectable, pero que puede introducir una baja en la eficacia biológica en sus descendientes.

## Objetivos

- Estudiar las diferentes etapas de la Meiosis I en una suspensión de células obtenidas de biopsias testiculares de ratones.
- Establecer las diferencias citológicas de las diferentes etapas de la Meiosis I (Leptoteno, zigoteno, paquitenio y diaquinesis)
- Identificar el bivalente sexual en ratones.
- Observar cromosomas de células germinales (metafases I y II en espermatocitos de ratón)

## Materiales

### Biológicos

- Ratones adultos (*Mus musculus*)

### Equipos

- Incubadora a 38°C
- Centrifuga clínica
- Microscopios
- Gradillas
- Chupos

### Vidriería

- Láminas
- Laminillas
- Tubos centrífuga fondo cónico de 15 ml
- Pipetas de 5 ml, 10 ml, 1 ml
- Pipetas pasteur
- Probetas



## Reactivos

- Solución isotónica 0.44% de KCl
- Solución hipotónica 0.075% de KCl, (A-2)
- Metanol químicamente puro,
- Acido Acético Glacial.
- Colorante Giemsa (A-7)
- Buffer Giemsa (Sorensen's Buffer) pH 6.8 (A-6)

## Procedimiento

Sacrificar los ratones machos, adultos de 8-10 semanas por una sobredosis de anestesia o dislocación cervical. Retirar los testículos, colocándolos directamente a la solución de KCl 0.44% (peso/volumen). Remover la túnica y separar con ayuda del estereoscopio los túbulos seminíferos que son colocados en una caja de petri con KCl. 0.44%. Picar los túbulos con las tijeras y con ayuda de las pipetas tratar de desprender la mayor parte de los espermatoцитos.

Recoger con la pipeta el material y llevarlo a un tubo de centrifuga cónico. Dejar decantar por 2-4 minutos el material de mayor tamaño y recoger el sobrenadante. La suspensión rica en células se centrifuga a 1000 rpm por 7 minutos. El sobrenadante es descartado y el pellet es resuspendido en 10 ml de KCl 0.075% (Solución Hipotónica.) Dejar 30-40 minutos a 37°C. Centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante es descartado. El pellet rico en células es fijado con 1 ml de Carnoy (2 metanol:1 ácido acético), resuspendido con ayuda de la pipeta pasteur. Completar hasta 7-8 ml de fijador, frío. Dejar actuar el fijador por 30 minutos. La suspensión es llevada a la centrifuga a 1000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante es descartado y el pellet es resuspendido nuevamente en un volumen pequeño.

Los extendidos pueden hacerse con los protocolos de secado al aire, goteando una o dos gotas de la suspensión celular sobre láminas, limpias, pre enfriadas. Los extendidos son coloreados con una solución de Giemsa al 4% en tapón fosfato pH 6.8 por 7 minutos. Secar al aire y observar al microscopio.

Identifique cada una de las etapas de la Profase I en su preparación. Elabore diagramas de sus observaciones.

## Cuestionario

1. Investigue que efectos tendrían las fallas en los diferentes estados de la meiosis y cuales serian sus consecuencias.
2. ¿Cuales son las principales funciones asignadas al CS? ¿Qué ocurre cuando este no se forma?
3. ¿En que casos cree usted que es adecuado realizar investigaciones en cromosomas meióticos?
4. ¿Cuántos quiasmas en promedio se presentan por célula y cuántos por cromosoma? (puede basar su respuesta en los datos estimados para cromosomas humanos).
5. ¿Pueden los bivalentes del paquitenio ser identificados? ¿Mediante que técnicas? ¿Qué significado tienen los cromómeros observados en este estado?

## Bibliografía citada

- Tettenborn U & Gropp A.** 1970. Meiotic nondisjunction in mice and mouse hybrids. *Cytogenetic.* 9: 272-283.
- Evans EP, Breckon G & Ford CE.** 1964. An air-drying method for meiotic preparations for mammalian testes. *Cytogenetics.* 3: 289-294.
- Evans EP, Burtenshaw MD & Ford CE.** 1972. Chromosomes of mouse embryos and newborn young: Preparations from membranes and tail tips. *Stain Technol.* 47: 229-234.

## Bibliografía de consulta

- Beiguelman B.** 1982. *Citogenética Humana.* El Guanabara. Río de Janeiro. 325 pp.
- Flecher JM.** 1979. Light Microscope analysis of meiotic prophase chromosomes by silver staining. *Chromosoma (Berl).* 72: 241-248.

- Frota Pessua O, Guimaraes P & Otto PA.** 1978. Genética Humana. Ed. Francisco Alves. 3a edición. Río de Janeiro. 800 pp.
- Moses MJ, Counse SJ & Paulson DF.** 1975. Synaptonemal Complex complement of man in spread of spermatocytes with detail of the sex chromosomes pair. Science. 187: 363-373.
- Moses MJ.** 1977. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). Chromosoma 60:99-114.
- Rooney DE & Czepokowski BH.** 1986. Human Cytogenetics. A practical Approach, IRL. Press Ltda. Ox.
- Therman E & Susman M.** 1993. Human chromosomes: structure, behavior and effects. 3ª Edición. Springer-Verlag. New York. 376 pp.
- Verna RS & Babu A.** 1989. Human Chromosomas Manual of Basic Techniques. Pergamon Press. New York. Oxford. 240 pp.

## CAPÍTULO 17

---

### *Cromosomas en abejas*

---

#### Introducción

Las abejas son organismos que presentan diversos mecanismos genéticos para su determinación de sexo; uno de ellos es la haplodiploidia: hembras diploides, provenientes de huevos fecundados y machos haploides, originados de huevos no fecundados; así el número cromosómico de los machos es la mitad con respecto al de las hembras de su especie.

Los machos de abejas a pesar de tener un número haploide de cromosomas producen espermatozoides con ese mismo número  $n$ , gracias a un proceso de meiosis anormal o pseudo-meiosis, en cuya primera división se realiza la duplicación de cromosomas, pero no su separación mientras que la segunda división transcurre como una mitosis normal, con la formación final de espermátidas con  $n$  cromosomas.

El número cromosómico en abejas varía mucho dentro de los diferentes grupos: desde  $n=6$  en machos de abejas solitarias del género *Lasioglossum* (Familia Halictidae) hasta  $n=18$  en machos de abejas sociales, sin aguijón de los géneros *Plebeia* y *Melipona* (Familia Apidae). Los diferentes números de cromosomas han surgido por procesos citogenéticos como la poliploidía combinada con fusiones o fisiones céntricas para dar números cromosómicos

como 14, 15, 17. Las abejas mas conocidas y estudiadas son aquellas del género *Apis* (Familia Apidae), abejas utilizadas comúnmente en apicultura. El número haploide de cromosomas del género es 16 (Curtis H & Barnes N, 1996).

## Objetivo

Familiarizar al estudiante con las técnicas utilizadas en la preparación y observación de cromosomas en un organismo con sistema de determinación de sexo haplodiploide.

## Materiales

### Biológicos

- Estadios inmaduros de *Apis mellifera*: Prepupas de hembras (7 días de vida); prepupas de machos de 10 días de edad; Pupas de ojos blancos y rosados de machos de *Apis mellifera*.

### Otros elementos

- Láminas, laminillas, cajas de petri pequeñas.
- Estuche de disección (agujas y pinzas de punta fina)
- Estereoscopio
- Microscopio

### Reactivos

- Colchicina -hipotónica 1
- Solución disgregadora 1.8 ml ácido láctico 85%, 1 ml ácido acético, 1.2 ml agua destilada
- Solución Fijadora:  
Fijador I (3 partes de Etanol: 1 de Acido Acético)  
Fijador II (1 parte de Etanol: 1 de Acido Acético)

- Colorante Giemsa (A-7 )
- Tapón Sorensen (0.06 M, pH 6.8)

## Métodos

### Procedimiento A

#### Disección:

Utilizando pinzas y agujas finas se hace la disección de la prepupa para extraer el ganglio cerebral. Se retira y limpia el ganglio

Transferir el ganglio, limpio a una lámina escavada que contenga varias gotas de solución hipotónica con colchicina (1% sol. citrato de sodio-0,1% colchicina) por 20 minutos a temperatura ambiente.

#### Disociación:

Transferir el tejido a una lámina plana y hacer la disgregación agregando una gota de solución disgregadora (1.8 ml ácido láctico 85%, 1 ml ácido acético, 1.2 ml agua destilada). Inclinar la lámina sobre papel secante para retirar exceso de solución.

#### Fijación:

Con la lámina inclinada, adicionar una gota de fijador Carnoy - Fijador I (3:1 Etanol: Acido acético)

Repetir éste paso 3 veces.

Adicionar una gota de solución fijadora II (1ácido acético: 1etanol)

Dejar secar al aire

#### Tinción:

Se cubre la lámina con Solución Giemsa 4% en Tapón Sorensen (0.06 M, pH 6.8) por 10 minutos, a temperatura ambiente. Se lava con agua de la llave y se deja secar verticalmente.

### Procedimiento B

#### Disección:

En ésta oportunidad se utilizan las pupas de machos de *Apis mellifera*. Se hace disección para extraer testículos, separando tórax de abdomen y presionando desde la parte posterior del abdomen para que salgan los testículos, los cuales se limpian cuidadosamente. Estos se ven como dos masas blancas

que al disociar dejan ver los testículos a manera de trapero. La disección se hace en solución hipotónica-colchicina.

Disociación:

Con agujas finas disociar el material y separar en varias láminas; disociar nuevamente siguiendo el mismo procedimiento usado para ganglio. Todos los demás pasos iguales al procedimiento A.

Hacer otras láminas utilizando pupas de ojo rosa y de ojo oscuro. Comparar los resultados.

### Procedimiento C

Disección:

En esta oportunidad se utilizan las pupas de machos de *Apis mellifera*. Se hace disección para extraer **testículos**, separando tórax de abdomen y presionando desde la parte posterior del abdomen para que salgan los testículos, los cuales se limpian cuidadosamente. Estos se ven como dos masas blancas que al disociar dejan ver los testículos a manera de trapero. La disección se hace en solución hipotónica-colchicina.

Disociación:

Con agujas finas disociar el material siguiendo el mismo procedimiento usado para ganglio.

Fijar en Carnoy durante 12 horas.

Retirar el material del Carnoy y sobre una lámina agregar una gota de Isopropanol. Ecurrir.

Cubrir el material con orceína lactoacética durante media hora.

Macerar en Acido Acético Glacial. Colocar una pequeña porción sobre una lámina y cubrir con laminilla.

Evaporar a 40°C. Llevar al microscopio y observar.

### Cuestionario

1. ¿Cuántos cromosomas espera ver en hembras de *Apis mellifera*?  
¿Cuántos en machos? ¿Por qué?
2. ¿Cómo es el proceso de espermatogénesis en machos de abejas? ¿Observó diferencias en las preparaciones con pupas de distinto color de ojo?

3. ¿Para que se usa la solución hipotónica?
4. ¿Cuál es el efecto del ácido acético, Giemsa, orceína? ¿y el ácido láctico?
5. ¿Qué utilidad tienen los estudios cromosómicos para la sistemática?

## Bibliografía citada

**Curtis H & Barnes N.** 1996. Invitación a la Biología. Médica Panamericana. 870 pp.

## Bibliografía de consulta

**Carvajal J.** 1995. Ensayo y selección de técnicas para estudios citogenéticos en *Apis mellifera*. Trabajo de Grado. Dpto. Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

**Hoshiba H.** 1985. Karyotype and banding analyses on haploid males of the honey bee (*Apis mellifera*) Proc. Jap. Acad. Vol 60. ser. B: 238-240.

**Kerr WE & Silveira da ZV.** 1972. Karyotypic evolution of bees and correspondig taxonomic implications. Evolution 26(2): 197-202.



## Apéndice de guías de citogenética

### A 1. Medios

Medio RPMI 1640, Gibco, con L-GLUTAMINA, sin bicarbonato de sodio y sin antibióticos. Para un litro de medio:

- a) Adicionar poco a poco 950 ml de agua bidestilada estéril a 15°C-20°C.
- b) Remover los restos de medio que hayan quedado adheridos en el empaque del medio con un poco de agua.
- c) Adicionar 2.0 gr. de  $\text{NaHCO}_3$  por litro del medio.
- d) Con agitación ajustar el pH 0.2-0.3 unidades por debajo del pH deseado. Este debe de ser ajustado con HCl 1N o NaOH 1 N. El pH es normalmente elevado 0.1-0.3 unidades por la filtración. El pH óptimo del medio debe ser ligeramente alcalino (7.2-7.4)
- e) Completar el litro con agua bidestilada.
- f) Esterilizar por filtración.
- g) Envasar en frascos de 100 ml, marcados, numerados, con fecha. Hacer a cada uno de los frascos la prueba de esterilidad. Conservar en la nevera.
- h) Adicionar la solución de antibióticos (Penicilina, estreptomycin) al 2% a cada frasco antes de emplearlo.

### A 2. Solución hipotónica

La solución hipotónica KCL 0.075 M se prepara disolviendo 5.591775 gr. de KCL en 1000 ml de agua bidestilada. Esta solución debe de ser conservada en la estufa a 37°C, y estar a esta temperatura en el momento de uso.

### A 3. Preparación de láminas

Usar siempre láminas nuevas, prelavadas. Limpiar con gasa con una mezcla de Etanol: Acetona (1:1); frotarlas enérgicamente. Dejarlas en Carnoy frío, en nevera por lo menos 12 -24 horas antes del goteo. Después de limpias, deben guardarse en cajas para evitar el polvo y no deben cogerse con la mano

para impedir el engrase de las mismas. Las láminas pueden ser colocadas en el congelador para tenerlas frías, en el momento de goteo. Esto sustituye el baño de agua con hielo, porque al salir de congelador se cubren con la humedad del ambiente.

#### A 4. Preparación de colchicina

La colchicina de marca Sigma se prepara en dos etapas: en primer lugar se prepara la solución madre a una concentración de 0.16%, en agua destilada estéril, la cual puede guardarse en un frasco oscuro en el congelador por varios meses. Luego se prepara la solución de uso diario a una concentración de 0.016%, (1 ml de la solución madre en 9 ml de agua destilada estéril.). De esta solución de trabajo, se toma 0.1 ml para cada cultivo de 5 ml.

#### A 5. Solución fijadora (Carnoy)

3 partes de Metanol: 1 Parte de Ácido Acético Glacial. El fijador debe ser fresco y estar frío para obtener mejores efectos en la fijación.

#### A 6 Buffer Giemsa (Buffer Sorensen's)

Tampón fosfato (0.06M) pH 6,8.

Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ... 4.05gr.  $\times$  500 ml

Fosfato de sodio dibásico\* ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )\* ... 4.25gr.  $\times$  500 ml

Solución de trabajo:

51 ml de solución (a) se mezclan con 49 ml de solución (b).

\* El fosfato de sodio dibásico puede ser:

Heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) pesar  $\times$  500 ml de agua destilada 8.04 gr

Dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) pesar  $\times$  500 ml de agua destilada 10.74 gr

#### A 7. Colorante Giemsa

Este colorante se puede obtener comercialmente ya preparado. Es importante filtrarlo antes de iniciar la coloración.

Preparación de Colorante en Polvo.

Disolver 1.0 gramo de Giemsa en polvo (Merck) en 54 ml de Glicerina, a 60°C en un baño María por dos horas.

Retirar del calor, dejar bajar la temperatura hasta la del medio ambiente. Adicionar 84 ml de Metanol. Guardar en un frasco oscuro, dejar madurar por lo menos una semana, después filtrar.

Almacenar en lugares frescos, oscuros, en frascos ambar, dado que la luz afecta el colorante.

#### **A 8. Preparación de levadura activada para el estímulo de médula ósea. (Lee & Elder 1980)**

Disolver 2-3 gr de levadura granulada de panadería (flehischmann) en 25 ml de agua tibia con glucosa 20% (puede emplear azúcar comercial o dextrosa) Incubar a 37°C la levadura por 30 minutos para activarla.

Inyectar el animal intraperitonealmente con 0.5 ml de esta solución por cada 25gr de peso corporal.

Este procedimiento debe hacerse 24 horas antes del sacrificio del animal. En algunos casos, cuando la actividad mitótica medular es muy baja, pueden hacerse dos estímulos seguidos cada 24 horas. En animales jóvenes o recién capturados una sola inyección en general es suficiente. En adultos o cautivos por largos periodos es recomendable el empleo de dos inyecciones con esta suspensión a intervalos de 24 horas.

#### **A 9. Preparación de aceto-orceína al 2%**

En un *elermeyer* de 250 ml calentar hasta la ebullición 25 ml de ácido acético con el fin de eliminar toda el agua que este posea. Dejar enfriar a temperatura ambiente y adicionar 1 gr de orceína. Tapar el *elermeyer* con un tapón perforado, al cual se le ha insertado un tubo de vidrio de 50 cm (diámetro 5 mm) de largo, para salida de vapores. Deja al baño María a 100°C por 2-3 horas. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Filtrar y guardar en lugar fresco dentro de una botella oscura.

#### **A 10. Preparación de Aceto-Carmin**

En un *elermeyer* grande preparar 500 ml de agua ácida (ácido acético al 45%). Llevar a la ebullición. Adicionar 5 gr de Carmín (Merck art 2233, o Gurr 34017 BHD) y dejar la solución a fuego lento por 5 minutos. Retirar del fuego y dejar reposar hasta que este fría. Filtrar. La solución de carmín puede ser conservada por largo tiempo en frascos oscuros.

**A 11. Solución ringer para insectos**

Para un litro de H<sub>2</sub>O destilada

128 mM NaCl: 75 gr

4.7 mM KCl: 0.35 gr

Ajustar pH a 7.4 -7.5 con NaHCO<sub>3</sub>

Alicuotar y esterilizar en autoclave. Guardar en nevera a 4°C

**A 12. Tapón McIlvaine pH 5.4**

gr de Fosfato de Sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

2.1 gr Acido Citrico. (H<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>).

500 ml Agua destilada.

**A 13. Solución para la coloración con Quinacrina**

Disolver una tableta de Atebrina o 100 mg en 200 ml de Tapón Mc Ilvaine pH 5.4. Disolver bien y filtrar. Guardar en frasco oscuro en nevera (2°-5°C).

**A 14. Solución para la coloración con naranja de Acridina.**

Solución stock: 1 mg/ml

100 mg de Naranja de Acridina se disuelven en 100 ml de agua destilada.

Esta solución puede ser guardada a 4°C en frasco oscuro por varios meses.

Solución de trabajo (100 ml):

95 ml de tapón SORENSEN (0.06 M, pH 6.8)

5 ml de Solución stock (1 mg/ml) de Naranja de Acridina.



## CAPÍTULO 18

---

### *Estructura y propiedades de los ácidos nucleicos y sus técnicas de estudio<sup>1</sup>*

---

#### **Estudio electroforético sobre la estructura, forma y tamaño del DNA**

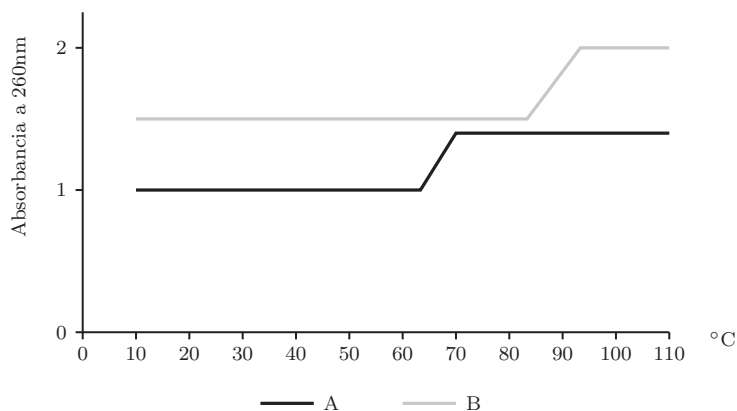
Dos moléculas de DNA de doble banda A y B de origen biológico diferente están constituidas de 647 pb. El DNA A es resistente a la acción de las exonucleasas mientras que el DNA B se hidroliza por la acción de estas enzimas.

- P1)** ¿Cuál es el peso molecular expresado en daltons de estas moléculas de DNA?
- P2)** Exprese en  $\mu\text{m}$  la longitud de estas moléculas.
- P3)** ¿Por qué el DNA A es insensible a la acción de las exonucleasas?  
Otra molécula de DNA, C, es lineal, mide  $0.33 \mu\text{m}$  y tiene un peso molecular de 291.000 daltons.
- P4)** ¿Cuál es la estructura de este DNA?

---

<sup>1</sup>Traducción y adaptación del libro: “L DNA De la cellule aux manipulation in vitro” de Bourier J y Bras-Heireng F. Université Paris - XI. Centre scientifique d'ORSAY

Si uno calienta las soluciones de DNA (A y B) y mide sus absorbancias a 260 nm en función de la temperatura, se obtienen los resultados expresados en la figura 18.1.



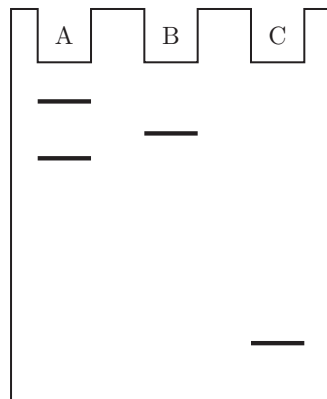
**Figura 18.1** Absorbancia de las moléculas de DNA (A y B) según la temperatura.

- P5)** ¿Por qué razón la absorbancia se mide a 260 nm?
- P6)** ¿Qué significan las diferencias registradas para los DNA A y B a 40°C?
- P7)** ¿Qué significa el aumento de absorbancia observado cuando la temperatura se incrementa?
- P8)** ¿En qué difieren los DNA A y B?

Una solución C1 del DNA C tienen una absorbancia de 2.8 a 25°C; mezclando 2.5 ml de esta solución con 7.5 ml de agua se obtiene la solución C2.

- P9)** Complete la figura 18.1, graficando la absorbancia de la solución C2 en función del incremento de temperatura.

Las muestras de estos DNA (A, B y C) se separan por medio de electroforesis en gel de agarosa. En la figura 18.2 se representa el patrón de migración de estas moléculas.



**P10)** Indique en la figura la polaridad de los electrodos.

**P11)** La distancia recorrida por la molécula C es compatible con los parámetros dados anteriormente?

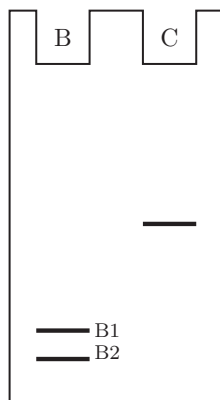
**P12)** Por qué se observa dos bandas en el DNA A?

**P13)** Sería posible convertir la forma más rápida de A en la forma más lenta? Cómo?

**Figura 18.2** Patrón de migración de las moléculas de DNA en gel de agarosa.

**P14)** Sería posible convertir las dos formas de A en una forma que migrara al mismo nivel que B? Cómo?

Una muestra de DNA B se calienta a 90°C por 5 min. y se lleva enseguida a 0°C; inmediatamente se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida de alta resolución. El DNA C se corre en paralelo en el mismo gel. El patrón de migración se representa en la figura 18.3.



**P15)** ¿Por qué se obtienen dos bandas? Explicar sus diferencias de migración con respecto al DNA C.

La composición de los nucleótidos de la banda B1 es la siguiente: A: 10%, C: 35%, G: 25% y T: 30%.

**P16)** Exprese la composición de nucleótidos de la banda B2. ¿En que sentido estos resultados resultan paradójicos si se comparan con los patrones de migración?

**Figura 18.3** Patrón de migración de los DNA (B y C).

**P17)** ¿La composición de nucleótidos de B es compatible con el patrón la figura 18.1 y con la respuesta a la P8?



Los RNA mensajeros totales se extraen de las células del organismo del cual se obtuvo el DNA B. Estos RNA mensajeros se fraccionan en dos partes. Una se mezcla con el DNA B1 y la otra con el B2. Las mezclas se llevan a 90°C y luego se dejan enfriar lentamente; posteriormente se someten a la acción de RNAasa y DNAsas que hidroliza las bandas sencillas de RNA y DNA. Se realiza luego una electroforesis con las dos mezclas y en ambos casos se observa una sola banda. En el caso de la mezcla con B2, la distancia de migración es más corta que en el caso de la mezcla con B1.

**P18)** ¿Cómo puede explicar estas diferencias de migración?

**P19)** ¿De la composición de nucleótidos del fragmento de RNA resistente a la RNAasa?

## **Estudios sobre desnaturalización y reasociación del DNA realizados por medio de centrifugación**

Las moléculas de DNA pueden ser rastreadas por medio de los isótopos de átomos que ellas pueden integrar. Los isótopos radioactivos más utilizados son el  $P^{32}$  y el  $H^3$ , cuya radiación se puede detectar por conteo de centelleo o por autorradiografía. El isótopo  $N^{15}$  una vez incorporado en el DNA tiene como efecto aumentar la densidad de la molécula de DNA. La centrifugación es una técnica de purificación y análisis de DNA.

Los gradientes de sacarosa de 10 al 40% permiten separar las moléculas de DNA según su migración ya que la densidad de estos gradientes es inferior a la densidad del DNA. Por otra parte, las soluciones salinas de metales pesados como el CsCl permiten obtener soluciones cuya densidad es igual o cercana a la densidad del DNA.

Se separan fragmentos de DNA de 40 a 50Kb a partir de un lisado bacteriano de *Escherichia coli*. Dos tipos de cultivos bacterianos fueron realizados:

- Cultivo tipo A: numerosas generaciones se desarrollaron en un medio que contiene Fosfato de Potasio  $P^{32}$ .
- Cultivo tipo B: numerosas generaciones se desarrollaron en un medio que contiene Nitrato de Potasio  $N^{15}$ .

El DNA proveniente del cultivo A se analiza por centrifugación de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se depositan alícuotas de  $500\ \mu\text{g}$  en la cumbre de gradientes de sacarosa preformados de 10 - 40%.
2. Se mezclan alícuotas de  $500\ \mu\text{g}$  en una solución de CsCl de densidad cercana a la del DNA ( $\rho = 1.7$ )
3. Tanto los gradientes de sacarosa como las mezclas de CsCl se centrifugan a alta velocidad durante una (1) hora y durante 48 horas.
4. Los tubos se perforan y se recogen las fracciones. Las figuras siguientes muestran las d.p.m. (desintegraciones por minuto) en función de las fracciones recogidas.

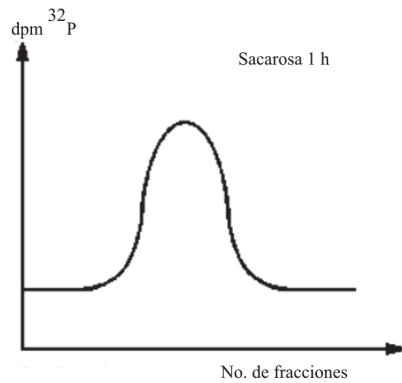


Figura 18.4

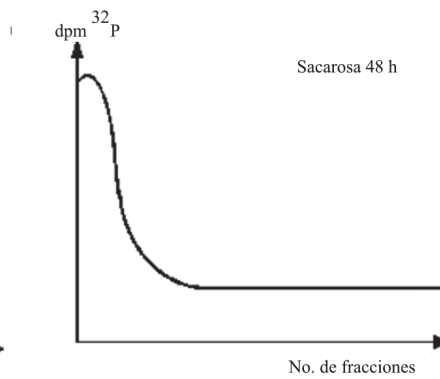


Figura 18.5

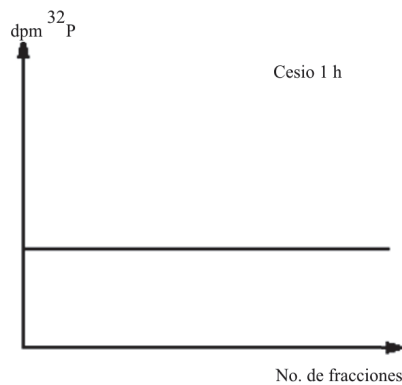


Figura 18.6

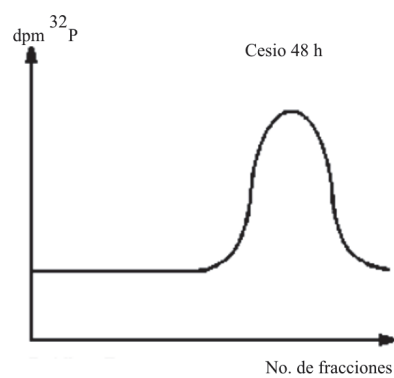


Figura 18.7

- P1)** Ubique en cada figura hacia la derecha o hacia la izquierda las fracciones correspondientes a la cumbre y a la base del tubo.
- P2)** Explique la diferencia en los perfiles de las figuras 18.4 y 18.5.
- P3)** Explique la diferencia en los perfiles de las figuras 18.6 y 18.7.
- P4)** Dibuje el perfil que se obtendría si uno centrifuga a velocidad elevada 500  $\mu$ g de DNA A durante 8 días en una solución de CsCl ( $g = 1.7$ ).

Se mezcla en cantidades iguales el DNA de A y el de B; 1mg de la mezcla se deposita en la cumbre de un gradiente 10 - 40 % de sacarosa y se centrifuga durante una hora y 1mg de la mezcla se disuelve en una solución de CsCl ( $g = 1.7$ ) y se centrifuga durante 48 horas a una velocidad elevada. Se obtiene los perfiles de las figuras siguientes:

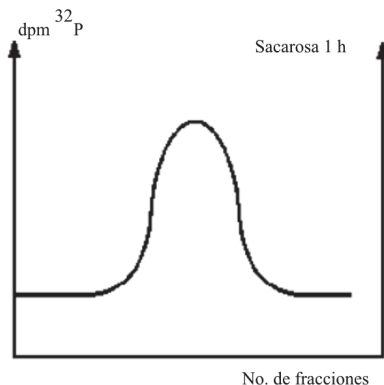


Figura 18.8

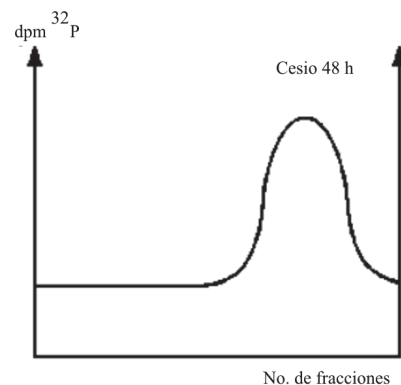


Figura 18.9

- P5)** ¿Por qué se obtienen para las figuras 18.8 y 18.9 los mismos perfiles que para las figuras 18.4 y 18.7?
- P6)** Sobre las figuras 18.8 y 18.9, superponer los perfiles de absorbancia a 260 nm de las diferentes fracciones.

El resto de la mezcla se calienta a  $90^{\circ}C$  hasta la desnaturalización total y luego se enfría lentamente. Se realizan las mismas centrifugaciones que en el párrafo precedente y se obtienen los siguientes perfiles:

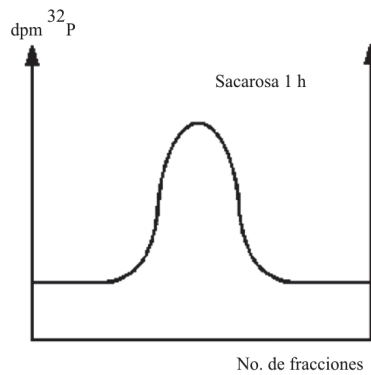


Figura 18.10

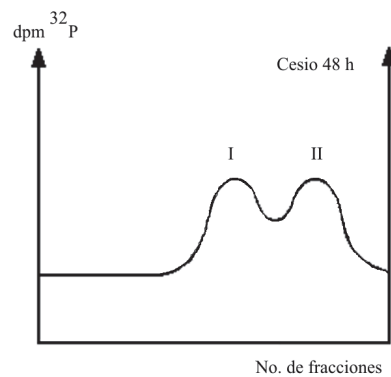


Figura 18.11

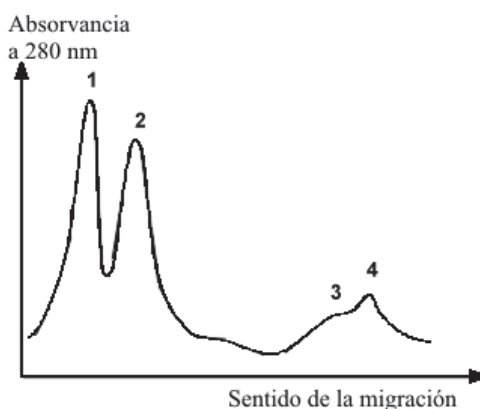
- P7)** ¿Por qué se obtiene el mismo perfil para la figura 18.10 que para las figuras 18.4 y 18.8?
- P8)** El pico II de la figura 18.11 sale en las mismas fracciones que el pico de las figuras 18.7 y 18.9. ¿Por qué?
- P9)** ¿A qué corresponde el pico I de la figura 18.11?
- P10)** ¿Son idénticas las concentraciones de DNA en los picos I y II?
- P11)** Sobre las figuras 18.10 y 18.11 superponer los perfiles de absorbancia a 260 nm de las diferentes fracciones.

Se mezclan los 2 DNA en las proporciones de 3/4 para A y de 1/4 para B. La mezcla se calienta hasta la desnaturalización total seguida de enfriamiento lento; 1mg de la mezcla se disuelve en una solución de CsCl ( $\rho = 1.7$ ) y luego se centrifuga a alta velocidad durante 48 horas.

- P12)** La asociación de las bandas se realiza al azar durante la renaturalización. Calcular las probabilidades de formación de los diferentes duplex (AA, AB, BB).
- P13)** Dibuje la gráfica que muestra los perfiles de radioactividad y absorbancia de las diferentes fracciones recogidas en esta experiencia.

## Los RNA citoplasmáticos de células animales

Con el propósito de estudiar los RNA citoplasmáticos de células animales se efectúan cultivos celulares en presencia de un precursor radioactivo de los ácidos nucleicos. Después de la eliminación de los núcleos y de las mitocondrias por centrifugación, los ácidos nucleicos se extraen, concentran y someten a una electroforesis en un gel cilíndrico de poliacrilamina al 2.5%. El trazado densitométrico del gel se obtiene midiendo la absorbancia a 260 nm.



**Figura 18.12** Perfiles densitométricos de los geles de RNA citoplasmático.

- P1)** ¿Cuál es el precursor radioactivo para marcar específicamente los ácidos ribonucleicos?
- P2)** Indicar en la figura 18.12 la polaridad de los electrodos y el sentido de la migración.
- P3)** ¿Qué perfil densitométrico se obtiene si la concentración de poliacrilamida se lleva al 7.5%? ¿Por qué sería conveniente aumentar esta concentración?
- P4)** Los RNAs pueden separarse según su velocidad de sedimentación en gradientes de sacarosa. Haga un esquema del tubo al final de la centrifugación localizando los RNAs correspondientes a los picos identificados en la electroforesis.
- P5)** El tubo de centrifugación se perfora y se recogen las fracciones cuya

radioactividad se mide. Dibujar el gráfico d.p.m en función del número de fracciones.

Se estudia el RNA citoplasmático extraído de reticulocitos de conejo; estas células están especializadas en la producción de hemoglobina; los RNA se purifican después de la eliminación de los núcleos. El trazado densitométrico del gel muestra un quinto pico.

**P6)** ¿A qué corresponde este quinto pico?

**P7)** La purificación de ribosomas libres de reticulocitos y el análisis electroforético de su contenido de RNA da un perfil donde los picos 4 y 5 han desaparecido. ¿A que corresponde el pico número 4?

**P8)** La alfa-amanitina es un antibiótico que inhibe específicamente la transcripción por medio de la RNA pol II. El pretratamiento de los reticulocitos con este inhibidor antes de suministrar el precursor radioactivo conduce a un perfil de radioactividad donde el pico 5 ha desaparecido. ¿Cuál es la naturaleza de los RNA sintetizados por la polimerasa II?

El RNA del pico 1 se purifica. Una solución de este RNA tiene una absorbancia de 0.8 a 30°C y una absorbancia de 1.1 a 90°C.

**P9)** Explique la diferencia entre las 2 temperaturas registradas.

Una columna de celulosa acoplada a oligodesoxitimidina retiene específicamente el RNA del pico 5. El mismo resultado se obtiene con los otros RNA sintetizados por la RNA Polimerasa II.

**P10)** ¿A qué se debe esta retención?



## CAPÍTULO 19

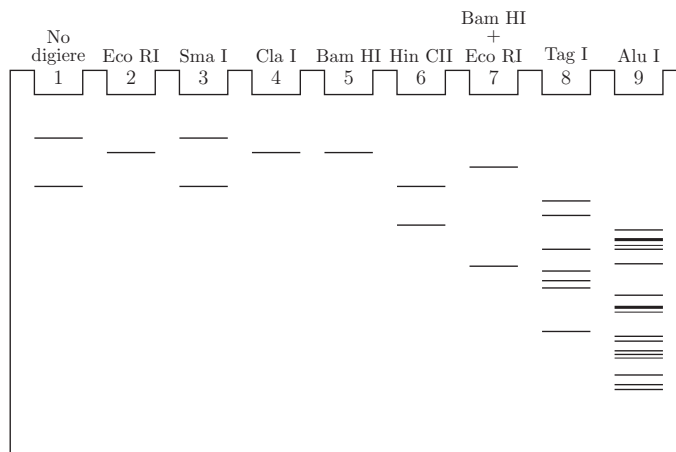
---

### *Herramientas para un estudio directo de la estructura del DNA*

---

#### Las endonucleasas de restricción

El DNA del plásmido pBR 322 es circular y comprende 4363p.b. El plásmido se somete a la acción de diversas endonucleasas de restricción en condiciones de hidrólisis total. Los productos de la digestión se someten a electroforesis en gel de agarosa. Los patrones de restricción se presentan en la figura 19.1.



**Figura 19.1** Electroferograma de las muestras digeridas con distintas endonucleasas del DNA del plásmido pBR 322 en gel de agarosa.



- P1)** ¿Por qué se observan dos bandas en el carril número 1?
- P2)** ¿Cuántos sitios de restricción reconocibles por las enzimas Eco RI, Sma I y Hin CII contiene el plásmido pBR 322?
- P3)** ¿El patrón de digestión por acción de estas enzimas habría sido el mismo si la molécula del plásmido hubiera estado linearizada en vez de estar circularizada?. Justificar caso por caso.

La DNAsa I, corta al azar los enlaces fosfodiéster sobre una u otra banda, permaneciendo el DNA en forma circular. Jugando con la temperatura de la reacción enzimática o con la concentración de la enzima, se pueden obtener hidrólisis parciales.

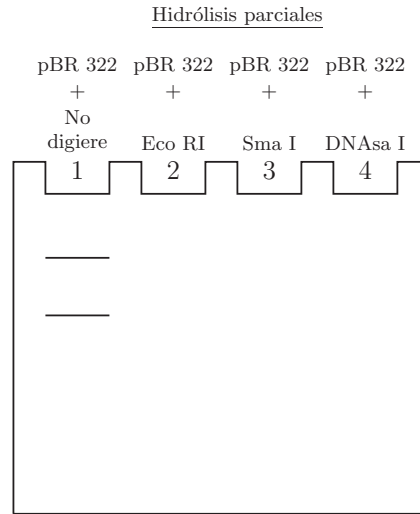
- P4)** Complete la figura 19.2 que representa el esquema de un gel después de electroforesis.

Las secuencias reconocidas por las endonucleasas de restricción se presentan en la siguiente tabla:

Nombre	Secuencia 5' → 3'
Alu I	A G C T
Bam HI	G G A T C C
Cla I	A T C G A T
Eco RI	G A A T T C
Hin CII	G T Py Pu A C
Sma I	C C C G G G
Taq I	T C G A

**Tabla 19.1** Secuencias reconocidas por las endonucleasas.

El tamaño de los fragmentos de DNA generados por la acción de Taq I sobre pBR 322 son: 1.444p.b., 1.307p.b., 475p.b., 368p.b., 316p.b., 312p.b. y 141p.b.



**Figura 19.2**

- P5)** La observación y la comparación de estos sitios de restricción permite mostrar una característica de las secuencias reconocibles por endonucleasas, ¿cuál es?

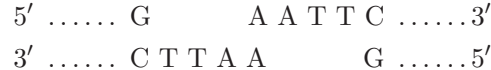
- P6)** Una misma región del pBR 322 es reconocida por dos enzimas, ¿cuál es?
- P7)** ¿Cuál es la distancia más pequeña en p.b., que de acuerdo a la figura I separa los sitios Eco RI y Bam HI? ¿Por qué?
- P8)** Expresa en gramos y en daltons los pesos moleculares de los 2 fragmentos generados por acción simultánea de Bam HI y de Eco RI. Detalle los cálculos.
- P9)** ¿La frecuencia de sitios de restricción de pBR 322 reconocibles por las enzimas utilizadas es compatible con la estimación teórica separada? Justificar para cada una de las enzimas.

La endonucleasa de restricción Eco RI genera extremos 5' fosfato según el esquema siguiente:

Sitio Eco RI



Extremos generados



Un experimentador somete pBR 322 al siguiente tratamiento experimental:

1. Hacer actuar Eco RI sobre pBR 322 y luego inactivar la enzima.
2. Completar las extremidades 5' fosfato por acción de la DNA pol.
3. Unir las extremidades rellenadas por acción de la ligasa.
4. Transformar una cepa *Escherichia coli* con el producto de la ligación para amplificar el DNA.
5. Purificar el nuevo plásmido (llamado pBR 422) a partir de un cultivo de bacterias transformadas.

- P10)** ¿Cuál es en p.b. el tamaño de pBR 422?  
El mismo protocolo anterior se aplica al pBR 322, pero utilizando Bam HI en vez de Eco RI. El nuevo plásmido se denomina pBR 522.

La presencia de pBR 322 confiere a las bacterias resistencia a la tetraciclina. Esta resistencia se mantiene con pBR 422 pero desaparece con pBR 522.

Extremo generado por Bam HI
5' ..... G
3' ..... C C T A G

**Tabla 19.2** Extremos generados por Bam HI.

- P11)** Localizar sobre un círculo que representa el DNA de pBR 322 los sitios Eco RI y Bam HI; sabiendo que el gene que confiere resistencia a la tetraciclina se extiende sobre 1200 nucleótidos, ubicar este gen sobre el mapa de pBR 322.
- P12)** ¿Por qué el llenado de los extremos generados por Bam HI por acción de la DNA polimerasa, luego de la circularización del plásmido, conduce a una modificación del fenotipo?
- P13)** ¿El resultado hubiera sido el mismo si Bam HI hubiera generado una extremidad cohesiva 5' fosfato de 3 nucleótidos en vez de 4?. Discutir su respuesta asumiendo varias hipótesis.

## Mapas de restricción

Se propone establecer el mapa de los sitios de restricción del plásmido pBR 322, es decir, determinar el orden y la distancia en p.b. que separa los diferentes sitios.

El pBR 322 posee sitios únicos para las endonucleasas Eco RI, Bam HI y Pvu II. El sitio Eco RI se escoge arbitrariamente como punto de referencia o punto 1, a partir del cual se determinan las distancias de los diferentes sitios reconocidos: por ejemplo Rsa I corta en tres sitios respectivamente alejados del sitio Eco RI 165p.b., 2282p.b. y 3847p.b.

Se realizan digestiones con 1 o 2 enzimas y las muestras se someten a electroforesis. Después de un tiempo adecuado, la migración se suspende y el gel se colorea con bromuro de etidio para visualizar las bandas en luz U.V. Para cada caso se determina la migración de fragmentos de DNA estándar de tamaño conocido. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

- P1)** ¿Cuál es el tamaño en p.b. del plásmido pBR 322?
- P2)** ¿Cuál es su peso molecular expresado en gramos y en daltons?
- P3)** ¿Cuál es en m la longitud de su circunferencia?
- P4)** ¿Cuales son los tamaños en p.b. de las bandas generadas por la enzima Rsa I?
- P5)** Detallar el razonamiento que permite determinar las posiciones relativas de los sitios Eco RI, Bam HI y Pvu II.

Carril	Endonucleasas de restricción	Número de bandas	Tamaño de las bandas (p.b.)
1	Eco RI + Bam HI	2	375 - 3988
2	Eco RI + Pvu II	2	2066 - 2297
3	Bam HI + Pvu II	2	1691 - 2672
4	Hin CII	2	1107 - 3256
5	Eco RI + HincII	3	456 - 651- 3256
6	Pvu II + HincII	3	1107- 1415- 1841
7	Bgl I	3	234- 1810- 2319
8	Eco RI + Bgl I	4	234- 881- 929- 2319
9	Pvu II + Bgl I	4	234- 903- 1416- 1810

**Tabla 19.3** Tamaño de los fragmentos del pBR 322 cortados con distintas enzimas de restricción.

**P6)** Dibujar el mapa de restricción de pBR 322 sobre un círculo calculando la posición de cada sitio. Por convención el primer sitio ubicado a partir de la posición 1, en el sentido de las agujas del reloj muestra el sitio de restricción de Bam HI.

**P7)** ¿Cuál es el número y tamaño de las bandas engendradas por la restricción mixta Rsa I + Bgl I?

La endonucleasa Sau 3A reconoce una secuencia de 4 pb.; la enzima Bam HI reconoce una secuencia de 6 pb. La digestión mixta entre Sau 3A + Bam HI da exactamente el mismo patrón que la digestión simple por acción de Sau 3A.

**P8)** Explique la similitud de los patrones obtenidos en los dos casos.

El plásmido pBR 322 confiere a las bacterias que lo llevan la resistencia a 2 antibióticos. El gen de resistencia a la tetraciclina está ubicado entre las posiciones 1 y 1.300; el gen de resistencia a la ampicilina está ubicado entre las posiciones 3.200 y 4200. El origen de replicación de este plásmido está incluido en la región 2.300 - 2.600.

**P9)** Ubicar estos genes en el mapa de restricción.

**P10)** Describir 5 pasos principales de un diseño experimental que permita seleccionar las bacterias transformadas con un plásmido pBR322 recombinado que contiene un inserto de DNA. Precisar el nombre de las enzimas y antibióticos utilizados.



## CAPÍTULO 20

---

### *El DNA: molécula portadora de información*

---

#### Estudio comparado de algunos genomas

La bacteria *Escherichia coli* es uno de los organismos autónomos más simples: se multiplica rápidamente a partir de agua, sales, minerales y una fuente de carbono orgánico; su “cromosoma” pesa  $2.64 \times 10^9$  daltons.

El bacteriófago T4 se absorbe a la superficie del colibacilo e inyecta su genoma constituido de una molécula de DNA de doble banda de  $54.4 \mu\text{m}$ . Veinte minutos después de la infección la bacteria se lisa y libera 200 nuevas partículas fágicas infecciosas.

El virus HIV, responsable del SIDA, es un retrovirus cuyo genoma está constituido de un RNA de 9.200 nucleótidos. En las células humanas infectadas se encuentra la información genética correspondiente al genoma viral integrada en el DNA cromosómico. De una línea celular a otra el lugar de integración es diferente.

El núcleo de células de ratón, encierran 1.36 m de DNA. Los datos genéticos estiman que el genoma de estos organismos codifica para 30.00 proteínas diferentes, cada una de las cuales depende de un gen único.

**P1)** Si las moléculas genómicas *Escherichia coli*, T4 y HIV codifican en su totalidad proteínas, calcular par cada una el número de genes impli-

cados asumiendo que el peso molecular promedio de una proteína es de 55.000 daltons.

- P2)** ¿Por qué el bacteriófago T4 es un parásito intracelular obligatorio?
- P3)** Los genes del virus HIV codifican una transcriptasa reversa. ¿Cuál es el papel de esta enzima en el ciclo del retrovirus?
- P4)** ¿Qué propiedad esencial de los ácidos nucleicos se ha utilizado en la metodología experimental que permitió evidenciar la inserción aleatoria en los cromosomas humanos de secuencias propias del HIV?
- P5)** Estimar la fracción del genoma de ratón que codifica para las proteínas.

Las regiones codantes de los genes de organismos superiores, que se traducen en proteínas, están intercaladas con varios fragmentos llamados “exones” separados por regiones no traducibles llamadas “intrones”. Estas secuencias intrónicas son eliminadas después de la transcripción durante la formación del RNA mensajero maduro.

En el humano el gen que codifica para el factor VIII de la coagulación está presente en el cromosoma X y sus mutaciones producen la hemofilia. Los 26 exones que lo constituyen representan solamente el 5% de los 186.000p.b. que conforman el gen.

- P6)** ¿Sabiendo que el cromosoma X es cuarenta veces más grande que el cromosoma *E. coli*, que porcentaje del cromosoma X representa el gen que codifica para el factor VIII de coagulación?
- P7)** Calcular el peso molecular del factor VIII.
- P8)** Comparar el tamaño de éste gen con el genoma del bacteriófago T4.

Teniendo en cuenta el cálculo efectuado para T4 en la pregunta número 1, está usted de acuerdo con la hipótesis que plantea que los exones representan solamente el 1% del genoma de los mamíferos? ¿Qué otro resultado confirma esta hipótesis?

## Los genes de quimiotactismo en *Escherichia coli*

La bacteria *E. coli* está dotada de flagelos que le permiten orientarse hacia las sustancias químicas que la atraen y huir de las nocivas. Los genes *fla*

intervienen en la estructura de los flagelos y los genes *mot* en la motilidad de los mismos. Los genes *che* son los responsables de la respuesta quimiotáctica. El DNA del cromosoma bacteriano tiene un peso molecular de  $2.6 \times 10^9$  daltons. Durante la conjugación la transferencia total de este DNA de una bacteria a otra necesita 100 minutos. Los genes *fla*, *mot* y *che* se localizan en una región que durante la conjugación se transfiere entre los 41 y los 42 minutos.

En la tabla 20.1 se dan los pesos moleculares de las proteínas codificadas por estos genes.

Gen	Peso	Gen	Peso	Gen	Peso
<i>che</i> A	75000 d	<i>che</i> W	12000 d	<i>che</i> Z	24000 d
<i>che</i> B	38000 d	<i>che</i> X	28000 d	<i>mot</i> A	31000 d
<i>che</i> M	60000 d	<i>che</i> Y	8000 d	<i>mot</i> B	39000 d

**Tabla 20.1** Peso molecular de las proteínas codificadas por los genes *che* y *mot*.

- P1)** Si el peso molecular promedio de una proteína codificada por un gen *fla* es el mismo que el de los productos de los genes *che* y *mot*, hay lugar para otros genes aún no descubiertos en esta región del cromosoma? Si su respuesta es afirmativa, diga cuantos.

El fragmento de DNA Eco RI—Eco RI que lleva los genes de *che* Z a *mot* A ha sido clonado e integrado en el fago lambda ( $\lambda$ ). El bacteriófago recombinado “ $\lambda$ -Rec” se utiliza para lisogenizar 9 cepas bacterianas, cada una de las cuales lleva una mutación única para uno de los genes del fragmento clonado. Así mismo, se lisogenizan las mismas cepas bacterianas con 2 fagos  $\lambda$  recombinados A y B que presentan cada uno una delección en el fragmento clonado.

En la tabla 20.2 se representan los fenotipos de las 9 cepas bacterianas mutantes lisogenizadas por:  $\lambda$  silvestre,  $\lambda$ -Rec,  $\lambda$ -A, y  $\lambda$ -B. El signo “+” indica que la cepa bacteriana receptora ha recuperado el fenotipo silvestre y el signo “-” indica que ella está afectada en sus funciones motrices o quimiotácticas.

- P2)** ¿Sabiendo que las delecciones de los fagos A y B han sido obtenidas *in vitro*, que metodología se ha utilizado para su construcción?
- P3)** ¿Cuales son los genes funcionales de *E. coli* que llevan los fagos A y B?



Cepas mutantes	Fenotipo de cepas	Fenotipo $\lambda$ - Silvestre	Fenotipo $\lambda$ -Rec	Fenotipo $\lambda$ -A	Fenotipo $\lambda$ -B
( <i>mot</i> A-)	-	-	+	-	+
( <i>mot</i> B-)	-	-	+	+	+
( <i>che</i> A-)	-	-	+	+	+
( <i>che</i> B-)	-	-	+	+	-
( <i>che</i> M-)	-	-	+	+	-
( <i>che</i> W-)	-	-	+	+	+
( <i>che</i> X-)	-	-	+	+	-
( <i>che</i> Y-)	-	-	+	+	-
( <i>che</i> Z-)	-	-	+	+	-

**Tabla 20.2** Fenotipos de las cepas bacterianas mutantes lisogenizadas con distintos tipos de fagos.

Los DNA de los fagos A y B son extraídos y mezclados en la proporción 1/3 de DNA de A y 2/3 de DNA de B. Después de desnaturalizarse, se someten a una renaturalización lenta para permitir la reasociación de las bandas sencillas. La observación al microscopio electrónico de la población P1 muestra dos (2) tipos de moléculas donde la hibridización es total. En cambio la población P2 muestra moléculas que se aparean estrechamente con excepción de los lugares donde se observan bucles.

- P4)** ¿A qué corresponden las dos clases de moléculas de la población 1?
- P5)** ¿Qué significan los bucles observados en la población 2?
- P6)** ¿Cuales son los genes comprendidos entre los dos bucles?
- P7)** ¿Cual es la proporción de moléculas dentro de la población tipo P1 y qué tipo de fagos están representados en cada una de ellas?
- P8)** ¿Las secuencias que conforman los bucles de la población 2 son realmente las mismas en todas las moléculas de la población 2? Analice su respuesta.

Este sistema experimental y los datos aquí utilizados son útiles para escoger entre dos hipótesis respecto al gen *che* A, al cual parece asociarse la síntesis de dos proteínas de 75.000 y 65.000 daltons

- Hipótesis I: El tamaño del gen *che* A puede corresponder a la síntesis de dos proteínas.

- Hipótesis II: El tamaño del gen no permite sino la síntesis de una proteína de 75.000 daltons que sería enseguida procesada para dar lugar a una proteína de 65.000 daltons.

Para decidir entre estas dos hipótesis, las moléculas de la población 1 y de la población 2 se fotografían por microscopía electrónica en presencia de un DNA circular de 2  $\mu\text{m}$  de circunferencia. La distancia comprendida entre los dos bucles de las moléculas de la población II corresponde al 60% de la circunferencia de este DNA circular.

**P9)** Justificar cual será entonces la hipótesis más probable.



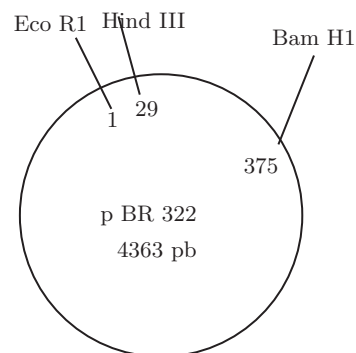
## CAPÍTULO 21

---

### *Clonación y purificación del gen bacteriano *Lys A**

---

Un biólogo se propone clonar el gen *Lys A* que está involucrado en la biosíntesis del amino-ácido lisina en *Escherichia coli*. Se dispone de un vector cuyo mapa genético se representa en la figura 21.1 y corresponde al pBR 322 que posee los genes de resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina.



**Figura 21.1**

El pBR322 se abre por acción de Bam HI. Además se dispone de DNA proveniente de una cepa silvestre de *Escherichia coli* tratado con Bam HI. Estos

DNA se mezclan en presencia de la enzima ligasa. Los plásmidos recombinados producidos por ligación se usan para transformar cepas de bacterias auxótrofas para lisina [*lys A*-].

Las bacterias transformadas se colocan en siete medios de selección y, después de la incubación, se registra la presencia o la ausencia de colonias. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Medios	Tetraciclina	Amplicilina	Lisina	Ausencia de colonias	Presencia de colonias
1	-	-	-		+
2	+	+	+		+
3	-	+	+		+
4	+	-	+		+
5	+	+	-	+	
6	-	+	-		+
7	+	-	-	+	

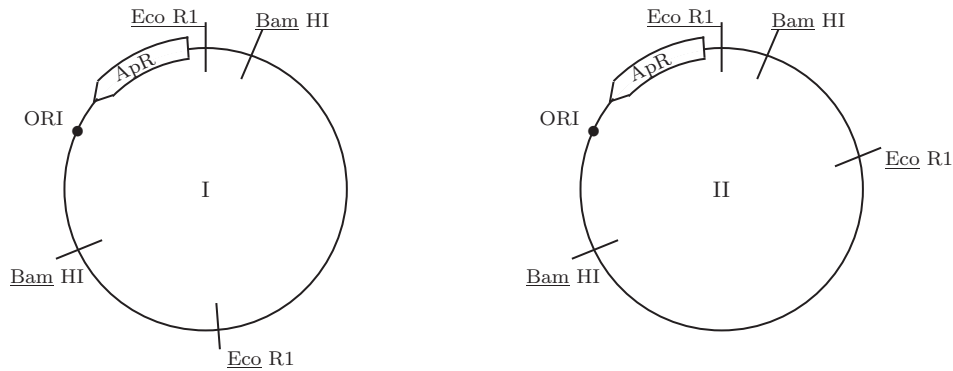
**Tabla 21.1** Presencia o ausencia de colonias de bacterias transformadas en distintos medios selectivos.

- P1)** Enuncie dos hipótesis que expliquen el crecimiento de bacterias en el medio 1.
- P2)** ¿Cuál es el tipo de plásmido presente en las bacterias seleccionadas en el medio 2?
- P3)** ¿Qué propiedades debe tener el medio que permite la selección de bacterias que poseen un plásmido que lleva el gen *Lys A* silvestre? ¿Por qué?
- P4)** Solamente uno de los siete medios de cultivo utilizados permite seleccionar sin ambigüedad las bacterias que poseen el plásmido deseado. ¿Cuál es?
- P5)** ¿Qué se puede concluir en cuanto al lugar donde se localiza el sitio Bam HI en el DNA vector?

Se aísla a partir de varios clones transformados [*Lys*+, Amp<sup>R</sup>, Tc<sup>S</sup>] el DNA plasmídico recombinante.

- P6)** ¿Cuántos tipos teóricos de plásmidos recombinantes se obtienen en esta experiencia? ¿Por qué?

Se estudian dos tipos de plásmidos donde los sitios para las endonucleasas Eco RI y Bam HI fueron localizados; igualmente se ubicaron los sitios de origen de la replicación (Ori) y el gen que confiere la resistencia a la Ampicilina (ApR). Estos dos tipos de plásmidos están representados en la figura 21.2.



**Figura 21.2**

- P7)** Sobre el esquema repisar con un lápiz de color la parte correspondiente al DNA insertado. Con otro color marque los fragmentos correspondientes al gen TcR inactivado.
- P8)** Proponga un experimento que permita diferenciar entre estos dos tipos de plásmidos.

Los DNA plasmídicos se someten a la acción de la endonucleasa de restricción Eco RI. Los fragmentos se separan por electroforesis y luego se cierran por acción de la ligasa. Algunos fragmentos utilizados para transformación se pierden y otros se multiplican en las bacterias confiriéndoles resistencia a la ampicilina. En todos los casos las bacterias permanecen auxótrofas para la lisina.

- P9)** Por qué algunos fragmentos se pierden durante la transformación?
- P10)** ¿Qué se puede concluir del hecho que, en ambos casos, los fragmentos Eco RI circularizados y capaces de transformar bacterias haciéndolas resistentes a la Ampicilina, no sean capaces de conferirles el fenotipo [Lys +]?

La digestión de los plásmidos I y II por la enzima de restricción Hin d III permite establecer los mapas de restricción presentes en la Figura 21.3.

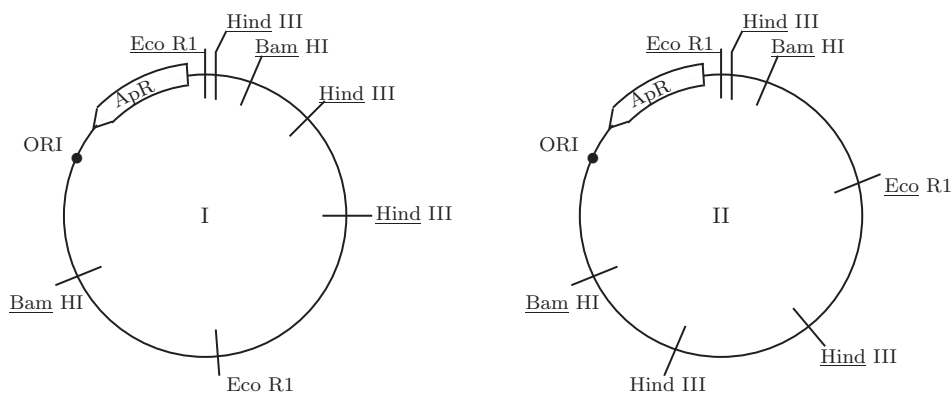


Figura 21.3

**P11)** Describa los cuatro pasos experimentales que permiten reducir el tamaño del inserto de DNA y que confiere el fenotipo [*Lys* +], usando una sola enzima de restricción. Indique con precisión el plásmido escogido, la enzima y la cepa de bacterianas utilizadas.

El plásmido III, originado en el experimento anterior se utiliza para establecer un mapa de restricción más preciso del fragmento de DNA insertado (Figura 21.4)

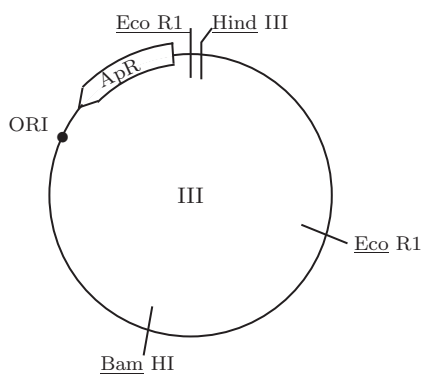


Figura 21.4

**P12)** Colorear la parte del DNA del plásmido III que corresponde al inserto de DNA.

En cuatro experimentos independientes, el DNA del plásmido III se somete a la acción de endonucleasas de restricción. Los fragmentos obtenidos se someten a una electroforesis en gel de agarosa conjuntamente con fragmentos de tamaño conocido:

1. Por acción de Bam HI aparece una banda única cuyo tamaño es superior a 6.000 p.b.
2. Por acción de Hin d III se obtiene el mismo resultado
3. Por acción conjunta de Bam HI + Hin d III aparecen dos bandas: una de 4.000p.b. y otra de 4.400p.b.
4. Por acción de Eco RI aparecen dos bandas: la más pequeña de las cuales mide 1.600p.b.

**P13)** Dar en número de p.b. el tamaño del inserto del plásmido III.

**P14)** Determinar el número en p.b. que separan el sitio Hin d III del sitio Eco RI en el DNA del inserto.

Se efectúa una doble digestión del plásmido III por las enzimas Bam HI y Eco RI.

**P15)** Dibuje, indicando la posición del ánodo y del cátodo, el gel de agarosa que muestra los diferentes fragmentos obtenidos; exprese su tamaño en p.b. y su peso molecular en daltons.





## CAPÍTULO 22

---

### *Organización de un gen de Levadura*

---

#### Introducción

Se dispone de una cepa haploide de levadura de cerveza que es auxótrofa para un metabolismo esencial “m”, de fenotipo [m-]. La mutación afecta únicamente un gen; este gen se estudia por medio de las técnicas de la ingeniería genética.

El DNA de una cepa haploide S1 de fenotipo [m+] se purifica y se somete, en dos experimentos separados, a la acción de las enzimas Eco RI y Bam HI. Los fragmentos obtenidos en los dos casos se integran en un plásmido vector. Este plásmido posee la propiedad de poder replicarse tanto en levadura como en *E. coli*. Los plásmidos recombinantes inducen la transformación de la cepa mutada [m-]. Cuando las levaduras transformadas se cultivan en un medio mínimo se obtienen algunos clones si los plásmidos contienen los fragmentos Eco RI y no se observa ningún clon cuando el DNA ha sido tratado con Bam HI.

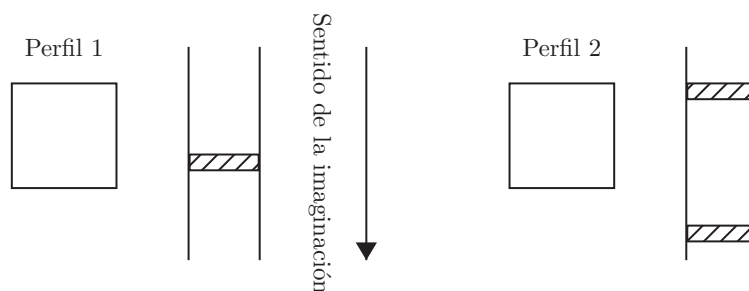
**P1)** ¿Qué información respecto a la estructura del gen afectado en la cepa [m-] se puede deducir de estos resultados?

A partir de los clones transformados que crecen en medio mínimo se aísla

un plásmido P, el cual se marca radioactivamente y sirve como sonda para hibridación para detectar los fragmentos de DNA que tienen información complementaria.

**P2)** Sabiendo que para marcar radioactivamente el plásmido P se utiliza la enzima polinucleótido-cinasa, describir las dos etapas del experimento de marcación indicando cual es el precursor radioactivo utilizado.

El DNA de la cepa silvestre S1 se digiere con Eco RI o con Bam HI. Los fragmentos se separaran por electroforesis en gel de agarosa y luego se desnaturalizan por acción de NaOH. Una membrana de nitrocelulosa se aplica sobre la superficie del gel por acción del flujo de Buffer. El DNA transferido a la membrana se coloca en contacto con el plásmido P marcado radioactivamente y desnaturalizado (Southern Blot). Se deja hibridar en condiciones adecuadas y la membrana se expone por contacto directo en la oscuridad con la película de autorradiografía. Al revelar la película se observan dos patrones diferentes según las enzimas utilizadas, tal como se muestra en la Figura 22.1.



**Figura 22.1**

**P3)** Indicar sobre el esquema la polaridad de los electrodos. Indicar en los recuadros la endonucleasa de restricción utilizada.

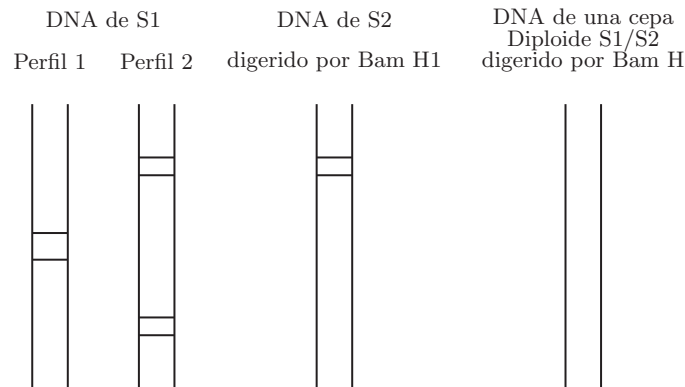
En DNA purificado a partir de otra cepa haploide silvestre S2, se digiere por Bam HI y los fragmentos se insertan en el plásmido vector. Los plásmidos recombinados sirven para transformar la cepa [m-]; obteniéndose clones en medio mínimo.

**P4)** ¿Por qué este resultado parece contradecir el resultado anterior?

**P5)** ¿En qué difieren el DNA proveniente de la cepa S2 del proveniente de la cepa S1? Justifique la respuesta.

Con el fin de profundizar en estos resultados, se realizaron las tres experiencias siguientes:

1. El DNA purificado a partir de la cepa silvestre S2, digerido por Bam HI, se somete a electroforesis en gel de agarosa en paralelo con el DNA de la cepa S1, digerido por Eco RI o por Bam HI. De nuevo el DNA radioactivo del plásmido P sirve como sonda. Después de la autorradiografía la Figura 22.2



**Figura 22.2**

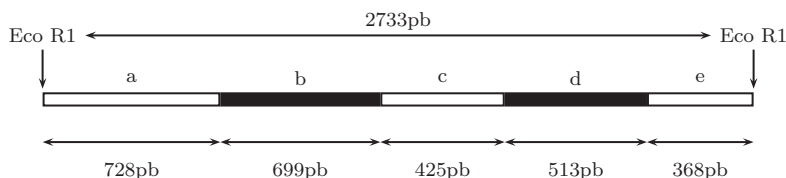
**P6)** ¿El resultado de la electroforesis obtenido para el DNA S2 concuerda o no con los resultados anteriores? ¿Por qué?

**P7)** Completar el esquema anterior ubicando las bandas radioactivas para el DNA purificado a partir de una cepa diploide S1/S2 y digerida por Bam HI

2. Se purifica, a partir de S1 y de S2, la proteína enzimática cuya actividad está ausente en la cepa [m-]. Se trata de un polipéptido de 38.500 daltons.

3. El plásmido se introduce en una cepa de *E. coli*, con el fin de producir cantidades suficientes para poder determinar la secuencia del fragmento Eco RI — Eco RI que lo contiene. La estructura de este DNA está representada

en la Figura 22.3 donde **a**, **c** y **e** corresponden a las siguientes regiones donde los seis marcos de lectura posible dan de manera estadística un codón STOP cada 20 codones. Mientras que las secuencias **b** y **d** tienen cinco marcos de lectura “cerradas” y uno de lectura “abierto”: 233 codones para **b** y 171 para **d**.



**Figura 22.2**

- P8)** ¿Qué es un marco lectura abierto (ORF)?
- P9)** ¿Cuál es el número de p.b. necesarios para codificar la proteína enzimática? ¿Alguna de las cinco regiones es potencialmente capaz de codificar para esta proteína?
- P10)** ¿Se transcribe la misma banda de DNA en las regiones b, c y d? ¿Por qué?
- P11)** ¿Qué información respecto a la estructura de los genes eucarióticos se puede concluir gracias a los resultados de este experimento?
- P12)** El DNA comprendido entre los dos sitios Eco RI difiere, de la cepa S1 a la cepa S2, en su estructura pero no en su expresión. Dos explicaciones pueden dar cuenta de este fenómeno ¿Cuáles?
- P13)** La secuencia del plásmido P presenta un sitio Bam HI en la región c. ¿De las dos explicaciones anteriores cual es la acertada?

## CAPÍTULO 23

---

### *Secuencia, transcripción y traducción del gen spo IIG*

---

Este ejercicio explota la información de una secuencia nucleotídica con el fin de poder deducir:

1. El sentido de la transcripción.
2. El marco de la lectura.
3. El encadenamiento de los aminoácidos.
4. Una propiedad biológica de la proteína.
5. Los nucleótidos afectados en algunos mutantes.

La secuencia del DNA representada a continuación es la de un fragmento de 120p.b. que está contenido enteramente en la parte traducida del gen *spo IIG* de la bacteria *Bacillus subtilis*.

5'P- GAAAAAACTG AAATTACGGT TGACGCACCT CTGGTATAAG <sup>40</sup> CTGCTGATGA AACTTGGGCT GAAAAGTGAT GAAGTCTATT <sup>80</sup> ACATAGGCGG GAGTGAAGCC CTGCCGCCTC CATTATCTAA <sup>120</sup> – 3'OH
--

- P1)** Calcular la longitud en angstroms, y el peso molecular en daltons de este fragmento.
- P2)** El peso molecular de la proteína codificada por el gen *spo IIG* es de 26.400 daltons. ¿Qué porcentaje de la proteína representa la parte codificada por este fragmento de DNA?

### El sentido de la transcripción

- P3)** Sabiendo que la secuencia dada es la de la banda no codante, escriba la secuencia transcrita. Justifique.

### El marco de lectura

- P4)** Teóricamente, la información genética que lleva el mRNA puede ser traducida de tres (3) modos diferentes. ¿Por qué?
- P5)** Indicar en la siguiente tabla las diferentes secuencias correspondientes a los codones sin sentido al nivel de las tres (3) cadenas de ácido nucleico.

5' P → 3' OH	Secuencias de Codones sin Sentido		
	1 <sup>er</sup> tipo	2 <sup>do</sup> tipo	3 <sup>er</sup> tipo
m-RNA			
Banda DNA codante			
Banda DNA no codante			

- P6)** Con barras verticales señale a continuación los tres (3) marcos de lectura posibles de la secuencia estudiada. En cada caso encuadrar los codones sin sentido.

### Primer marco posible de lectura

```
5'P-GAAAAAACTG AAATTACGGT TGACGCACCT CTGGTATAAG40  
CTGCTGATGA AACTTGGGCT GAAAAGTGAT GAAGTCTATT80  
ACATAGGCGG GAGTGAAGCC CTGCCGCCTC CATTATCTAA120 – 3'OH
```

### Segundo marco posible de lectura

```
5'P- GAAAAAACTG AAATTACGGT TGACGCACCT CTGGTATAAG40  
CTGCTGATGA AACTTGGGCT GAAAAGTGAT GAAGTCTATT80  
ACATAGGCGG GAGTGAAGCC CTGCCGCCTC CATTATCTAA120 – 3'OH
```

### Tercer marco posible de lectura

```
5'P-GAAAAAACTG AAATTACGGT TGACGCACCT CTGGTATAAG40  
CTGCTGATGA AACTTGGGCT GAAAAGTGAT GAAGTCTATT80  
ACATAGGCGG GAGTGAAGCC CTGCCGCCTC CATTATCTAA120 – 3'OH
```

- P7)** ¿Cual es el marco de lectura que se ha utilizado efectivamente para la síntesis de la proteína? Justificar la respuesta.
- P8)** Si en el curso de una experiencia se establece la secuencia de una sola cadena de un fragmento de DNA que se sabe forma parte de un gen, será posible, en teoría, ¿determinar el sentido de la transcripción? ¿Cómo?

### El encadenamiento de los aminoácidos

- P9)** Identificar sobre la secuencia anterior la extremidad que codifica para la región N-terminal del fragmento protéico. Explique.



**P10)** Indicar en la tabla siguiente la composición en aminoácidos del fragmento protéico analizado.

Amoniácido		Número	Aminoácido		Número
Ala	Alanina		leu	Leucina	
arg	Arginina		lys	Lisina	
asn	Asparagina		met	Metionina	
asp	Acido Aspártico		phe	Fenilalanina	
cys	Cisteina		pro	Prolina	
gln	Glutamina		ser	Serina	
glu	Acido glutámico		thr	Treonina	
gly	Glicina		trp	Triptofano	
his	Histidina		tyr	Triptofano	
ile	Isoleucina		val	Valina	

## Una propiedad biológica de la proteína

**P11)** La proteína codificada por el gen *spo IIG* interactúa con el DNA. Es este hecho compatible con la composición en aminoácidos del fragmento analizado? ¿Por qué?

## Nucleótidos modificados en algunos mutantes

Esta proteína se purifica a partir de la cepa salvaje y de 3 mutantes afectados en el gen *spo IIG*. Se somete a una electroforesis en condiciones no-desnaturalizantes donde la migración se efectúa según la carga eléctrica.

**P12)** ¿Qué nucleótido deberá uno encontrar en la posición 71 en los mutantes para obtener los perfiles de electroforesis en la Figura 23.1.

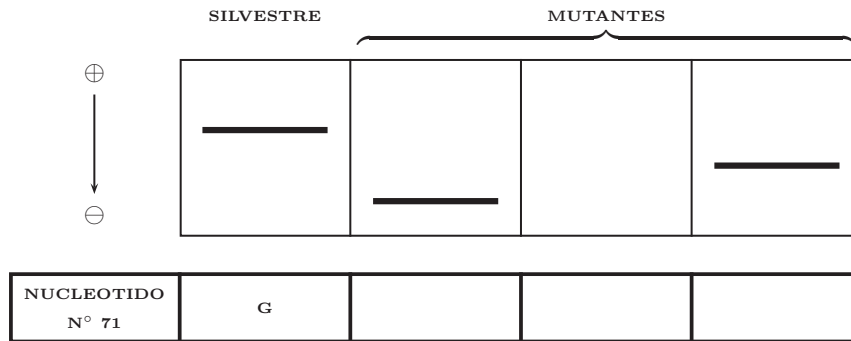


Figura 23.1

Resumiendo:

La tabla siguiente se refiere a 18 de los 120 nucleótidos de la secuencia:

DNA de doble banda	...	CAT				ATA		...
mRNA	...		GUC			GAA		...
Anticodon en tRNA	X			CAG				X
Aminoácidos	X				lys		trp	X

**P13)** Determinar el sentido de la transcripción. Justificar.

**P14)** Completar la tabla anterior identificando las dos cadenas del DNA y orientando el mRNA.

**P15)** Haga un esquema de la cadena polipéptica indicando la posición relativa de los amino-ácidos determinados.



## CAPÍTULO 24

---

### *La síntesis de proteínas*

---

#### Introducción

En la bacteria *Escherichia coli* nos proponemos estudiar:

- Los diferentes elementos que constituyen el aparato traduccional y estimar la fracción del genoma bacteriano que codifica este aparato.
- Los parámetros cinéticos de la traducción.
- Un mutante termosensible para un elemento del aparato traduccional y la identificación de la etapa afectada en este mutante.

#### El aparato traduccional

Los ribosomas de *E. coli* comprenden tres (3) rRNA ribosómicos: 23S, 16S y 5S. Estos RNA son cotranscritos en el orden 16S, 23S y 5S; una RNAasa corta el transcrito primario y libera tres (3) moléculas: (1) de 550.000 daltons, (2) de 1'070.000 daltons y (3) de 40.000 daltons. Se busca determinar el número de genes que codifican estas moléculas rRNA.

Se prepara DNA cromosómico a partir de un cultivo de bacterias que ha efectuado varias generaciones en presencia de timidina- $[H^3]$ . Este DNA se rompe mecánicamente de modo que permita generar grandes fragmentos, luego se calienta hasta su desnaturalización total y se enfría bruscamente.

Una cantidad muy pequeña de este DNA se mezcla con un buffer que contiene 80% de formamida y NaCl 1M, con un exceso de una preparación purificada de RNA ribosomal. La mezcla se calienta 2 minutos a 75°C y se deja varias horas a 45°C. Estas condiciones favorecen la formación de híbridos. La mezcla de hibridación (DNA/RNA) se trata con DNAasa. Después de la digestión enzimática la preparación se filtra sobre una columna de Sephadex G-50, que deja pasar los polinucleótidos y retiene los nucleótidos libres. En el líquido recogido de la columna se encuentra 0.45% de la radioactividad inicial del DNA.

- P1)** ¿Qué rRNA se encuentra en la extremidad 3'OH del transcrito primario?
- P2)** ¿Por qué se mezcla un exceso de rRNA al DNA genómico y cuál es el objetivo del investigador al utilizar las condiciones mencionadas de hibridización, la DNAasa y la filtración en G-50?
- P3)** Si el DNA de *Escherichia coli* contiene  $4 \times 10^6$  p.b.; calcular la longitud del DNA que hibridiza los rRNA.
- P4)** ¿Cuál es el número mínimo de p.b. del operón que codifica los rRNA?  
¿Cuántas copias de este operón existen en *E. coli*?

Los ribosomas también contienen proteínas. El RNA 16S está asociado a 21 proteínas y el RNA 23S a 34 proteínas. Cada especie proteica está codificada por un único gen. Estas proteínas tienen un peso promedio de 17.600 daltons y contienen más del 35% de arginina y lisina (amino-ácidos básicos).

- P5)** ¿Qué propiedad de las proteínas ribosomales se deriva de su riqueza en residuos básicos?
- P6)** ¿Cuál es el número mínimo de p.b. necesarios para codificar la totalidad de las proteínas ribosomales?
- P7)** La estreptomicina es un inhibidor de la síntesis proteica bacteriana. En un mutante de *E. coli* [str<sup>R</sup>] la movilidad electroforética de la proteína ribosomal P20 está alterada. Proponga una hipótesis en cuanto al modo de acción de este antibiótico.

La molécula adaptadora entre un codón y el aminoácido correspondiente es un t-RNA, que posee una secuencia complementaria del codón (el anticodón) y es capaz de fijar un aminoácido por intermedio de una amino-acyl-tRNA-sintetasa. Esta enzima fija el aminoácido correcto sobre el t-RNA. Hay 20 especies de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas y 20 especies de amino-acyl-tRNA-sintetasas codificadas cada una por un gen único.

Algunos codones corresponden a un mismo aminoácido y son reconocidos por el mismo tRNA; se considera que las diferentes especies de tRNA representan los 7/8 del número posible de codones. Cada tRNA está constituido en promedio de 80 nucleótidos y está codificado por un gen que existe en 5 copias.

- P8)** ¿Cuál es el número teórico de codones posibles?
- P9)** ¿Cuál es el número mínimo de p.b. del DNA genómico necesario para codificar los tRNA y las amino-acyl-tRNA-sintetasas, sabiendo que estas proteínas tienen un peso molecular promedio de 88.000 daltons?
- P10)** Ciertas mutaciones que hacen aparecer un codón sin sentido en un gen se pueden suprimir fenotípicamente por una segunda mutación en un gen que codifica un tRNA. ¿Qué hipótesis permite explicar este hecho?

Otras nueve proteínas son indispensables para el funcionamiento del ribosoma; se trata de los factores IF1, IF2 e IF3 implicados en la iniciación de la traducción. Los factores EF-Tu, EF-Ts y EF-G son necesarios para la elongación de la cadena polipeptídica. Los factores de terminación de la traducción RF1 y RF2 son la peptidil transferasa que establece el enlace peptídico entre 2 aminoácidos. Cada proteína está codificada por un gen único; la suma de sus pesos moleculares es de 330.000 daltons.

- P11)** ¿Calcular el número mínimo de p.b. necesario para la síntesis de proteínas de estos nueve factores.
- P12)** ¿Cuál es el número mínimo de p.b. de DNA necesarios para la síntesis del aparato traduccional?
- P13)** Sabiendo que las regiones intragénicas y que las regiones 5'P y 3'OH no traducibles del m-RNA representan el 10% del porcentaje de la estimación precedente, ¿cuál es el porcentaje de DNA genómico implicado en la síntesis de proteínas del aparato traduccional?

## Cinética de traducción del gen *lac Z*

La  $\beta$ -galactosidasa es una enzima tetramérica codificada por un cistron único *lac Z* que dirige la síntesis de proteínas de un polipéptido de 1.021 aminoácidos. El gen *lac Y* se cotranscribe con *lac Z* y dirige la síntesis de un permeasa de membrana indispensable para la penetración de lactosa en el citoplasma. La organización genética de la región cromosómica está representada en la Figura 24.1.

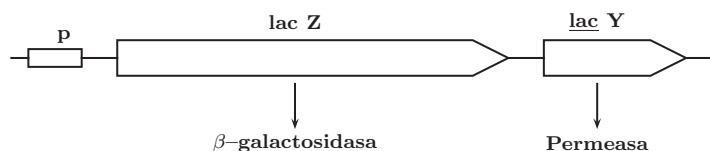


Figura 24.1

En ausencia de lactosa la transcripción de *lac Z* y de *lac Y* a partir del promotor P está reprimida por la fijación de una molécula de represor al nivel del operador. En estas condiciones no hay sino cinco (5) moléculas de  $\beta$ -galactosidasa por bacteria.

La síntesis de  $\beta$ -galactosidasa está inducida por su sustrato, la lactosa, que al combinarse con el represor, impide que éste se fije sobre el operador. Las bacterias inducidas completamente encierran 5.000 moléculas de  $\beta$ -galactosidasa por bacteria. A partir del momento en que la lactosa se añade al cultivo, se estima que son suficientes cinco (5) segundos para penetrar a las bacterias, fijarse al represor y liberar de este modo el promotor P.

**P14)** Sabiendo que en las bacterias cultivadas en presencia de lactosa la  $\beta$ -galactosidasa representa el 5% de la masa proteica total. ¿Cuál es la ventaja de este sistema de regulación?

**P15)** ¿Cuál es la eficacia de la represión del promotor del gen *lac Z* por el represor?

**P16)** ¿Por qué razón en ausencia de lactosa, es indispensable que la represión no sea total?

Una suspensión bacteriana proveniente de un cultivo efectuado en ausencia de lactosa se somete al protocolo siguiente:

1. A tiempo  $t_0$  se añade la lactosa.

2. A intervalos regulares de tiempo se toman alícuotas que se mezclan inmediatamente a una concentración alta de cloranfenicol, el cual bloquea instantáneamente la síntesis proteica.
3. Para cada alícuota tomada se determina la actividad de  $\beta$ -galactosidasa presente en el extracto celular.

Los resultados de este experimento se presentan en la siguiente figura 24.2.

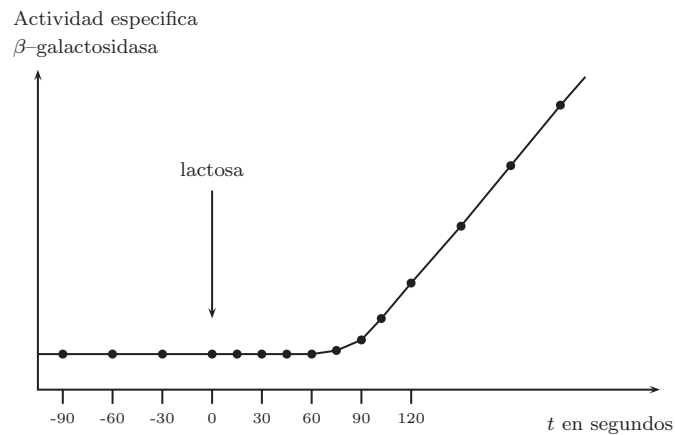


Figura 24.2

- P17)** ¿Qué significa el “plateau” observado antes de  $t_0$ ?
- P18)** ¿Qué significa el “plateau” al mismo nivel de  $t_0$  a  $t_{+75}$  segundos?
- P19)** La transcripción del DNA se efectúa a razón de 45 nucleótidos por segundo, ¿cuál es la velocidad máxima de traducción en aminoácidos por segundo?
- P20)** Para hacer este cálculo, ¿qué correlación se debe establecer entre la transcripción y la traducción en *E. coli*?
- P21)** Siendo la  $\beta$ -galactosidasa una enzima tetramérica, ¿cómo se puede conciliar a la velocidad calculada en la pregunta 19 y el resultado del experimento?



## Estudio de un mutante termosensible afectado en el aparato traduccional

**P22)** Considerando el fenómeno analizado, ¿por qué es importante estudiar un mutante condicional, es decir un mutante que únicamente expresa su mutación en condiciones particulares del medio?

Se aísla un mutante termosensible de *E. coli* que crece normalmente a 30°C, pero que es incapaz de multiplicarse a 37°C. Se diseñan los siguientes experimentos para estudiar la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa en el mutante:

1. Las bacterias se cultivan durante varias generaciones a 30°C y se reparten en dos lotes A y B. Luego se trasladan a 37°C durante 30 minutos, y posteriormente se reciben en medio con lactosa y se dejan a 37°C por otros 15 minutos.
2. El RNA proveniente del lote A se extrae, purifica y somete a electroforesis en gel de agarosa. Una vez transferidos los fragmentos a un filtro de nitrocelulosa, este se pone en contacto con un plásmido radioactivo que posee el gen *lac Z*, previamente desnaturalizado. La autorradiografía revela la presencia de un RNA de alto peso molecular que hibridiza con el plásmido.
3. Se realiza un extracto a partir de las bacterias del lote B: no se detecta ninguna actividad  $\beta$ -galactosidasa.

**P23)** Los resultados de estas experiencias parecen indicar que el aparato traduccional está afectado. ¿Por qué?

Esta bacteria se divide a un ritmo muy lento a la temperatura de 35°C. Se efectúa la experiencia siguiente:

1. La  $\beta$ -galactosidasa se purifica a partir de un cultivo inducido de la cepa silvestre. La enzima se inyecta en conejos siguiendo los protocolos de inmunización adecuados. Los anticuerpos anti-inmunoglobinas obtenidos se marcan con iodo radiactivo [ $I^{125}$ ].
2. Las bacterias de la cepa mutante se cultivan a 30°C se agrega lactosa y son llevadas a 35°C durante 15 minutos, después son recolectadas. Las proteínas se extraen, purifican y someten a una electroforesis en gel

de poliacrilamida. Por la técnica de “Western Blot”, las proteínas se transfieren a un filtro. El filtro se pone en contacto con los anticuerpos radioactivos [ $I^{125}$ ] anti- $\beta$ -galactosidasa y se somete a autorradiografía.

El mismo diseño experimental se aplica a las bacterias de la cepa mutante cultivada a  $30^{\circ}\text{C}$ , de la cepa mutante cultivada a  $37^{\circ}\text{C}$  y de la cepa silvestre cultivada a  $37^{\circ}\text{C}$ .

La siguiente figura representa el esquema de la autorradiografía:



**P24)** Explicar la aparición de las bandas en el caso de las bacterias de la cepa mutante cultivadas a  $35^{\circ}\text{C}$ .

**P25)** Estas proteínas tienen la extremidad N-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa; ¿cuáles pueden ser los elementos del aparato traduccional afectados en el mutante?

La Kirromicina es un antibiótico que tiene afinidad por el polipéptido EF-Tu. El crecimiento de la cepa silvestre está alterado a todas las temperaturas por acción de este antibiótico, sin embargo el mutante termosensible es insensible a este antibiótico.

**P26)** ¿Cómo sirve este resultado para precisar la respuesta a la pregunta 25?

**P27)** ¿Por qué este mutante es insensible a la kirromicina?



## CAPÍTULO 25

---

### *Extracción y visualización de ácidos nucleicos*

---

#### Introducción

Hasta 1944, no quedó claro qué componente químico de los cromosomas formaba los genes y constituía el material genético. Se sabía que los cromosomas estaban formados por ácidos nucleicos y proteínas, ambos componentes se consideraban candidatos. Sin embargo, en 1944 surgieron pruebas experimentales directas de que los ácidos nucleicos, en concreto el DNA, eran los que servían de base a la información en el proceso de la herencia. Una vez reconocida la importancia del DNA en los procesos genéticos, se intensificó la investigación para conocer tanto la base estructural de esta molécula como la relación entre su estructura y su función. Entre 1944 y 1953 muchos científicos buscaron información que pudiera responder a una de las preguntas más inquietantes de la historia en biología: ¿cómo puede servir el DNA de base genética para los procesos de la vida?

Los esfuerzos se vieron recompensados en 1953 cuando James Watson y Francis Crick expusieron sus hipótesis sobre la naturaleza de doble hélice del DNA. El DNA se trata de un material dispuesto en una doble hebra, las dos hebras son antiparalelas entre sí, los cuatro nucleótidos (adenina, guanina, citosina, y timina) se encuentran dispuestos a lo largo de las hebras cuyo esqueleto está conformado por azúcares y grupos fosfato. Adicionalmente,

frente a una guanina siempre existe una citosina y frente a una adenina siempre existe una timina.

Actualmente y con el avance de la tecnología es relativamente fácil extraer DNA de numerosas fuentes: tejido (sangre, músculo, cabellos, hueso), trozos de tela o papel de filtro impregnados de sangre, materia fecal, células epiteliales bucales, etc. La mayoría de las técnicas buscan destruir la membrana celular mediante el uso de detergentes fuertes, al igual que la desintegración de proteínas mediante la adición de un agente que incremente por encima o por debajo el pH en el cual la proteína es estable, mediante el uso de solventes orgánicos fuertes que disuelven las proteínas o mediante un fuerte incremento en temperatura que desnaturalice las mismas.

Como resultado de las diferencias en peso molecular y carga neta de los ácidos nucleicos, es posible separar los ácidos nucleicos mediante la técnica de electroforesis y posteriormente visualizarlos. Esta técnica permite separar las moléculas en un campo eléctrico, en donde los sustratos utilizados más comunes son agarosa y acrilamida, estos proporcionan diferentes grados de resolución en la separación de las moléculas. La adición de Bromuro de Etidio al gel de agarosa permite la visualización de los ácidos nucleicos bajo luz ultravioleta.

La relativa facilidad en la extracción del material genético lo hace ideal para diferentes estudios que incluyen desde pruebas diagnósticas para determinadas enfermedades, estudios de biodiversidad, pruebas de paternidad, y estudios de medicina forense entre otros.

## Materiales

### Equipos y otros

- Papel de filtro
- Tubos Eppendorf (1.5 ml)
- Puntas
- Microcentrífuga
- Baño María
- Transiluminador
- Guantes
- Micropipetas
- Lancetas
- Cámara de electroforesis
- Incubadora

## Reactivos

- Chelex 100 preparado al 20%
- Acetato de Na 2M
- 20 SSC (174g/L NaCl, 88.2g/L Citrato de Na pH 8.0)
- Etanol puro y frío 100 y 70%
- Agarosa 1%
- Fenol Cloroformo Isoamil (25:24:1)
- Buffer de electroforesis: TBE 0.45 M Tris, 0.45 M ácido bórico, 10 mM EDTA pH 8.0
- Proteinasa K (20 mg/ml).
- SDS 10%
- Fenol Cloroformo Isoamil (25:24:1)
- Solución salina 0.9%
- Bromuro de etidio
- TE: 10 mM Tris + 1 mM EDTA (pH 8.0)
- DTT

## Métodos

Esta práctica está diseñada para que un grupo preseleccionado de estudiantes realice con anticipación al laboratorio y con ayuda del profesor la extracción de DNA a partir de sangre fresca, los mismos estudiantes serán responsables de explicar a su correspondiente laboratorio los detalles y fundamentos del procedimiento. El protocolo de extracción de esta parte del laboratorio corresponde al protocolo 1, el cual es más detallado y extenso que aquel que se desarrollará durante las horas del laboratorio.

Durante las horas regulares de laboratorio, todos los estudiantes serán distribuidos por grupos. Con protocolos más cortos y sencillos que el protocolo 1 cada grupo realizará extracciones a partir de sangre fresca al igual que extracción de sangre impregnada en papel de filtro. Estos protocolos corresponden a las secciones 2a, 2b, y 2c.

Finalmente la sección tres corresponde a la visualización del DNA usando tres protocolos diferentes, además de muestras adicionales como mRNA, marcadores de peso molecular conocido etc.

### 1. Extracción de DNA partir de sangre con el método SSC

Extraer un pequeño volumen de sangre utilizando un anticoagulante (EDTA 7.5%). Mezclar bien y alícuotar en volúmenes de unos 700 ml en

tubos Eppendorf de 1.5 ml de volumen. Añadir 800 ml de 1×SSC, mezclar por inversión varias veces. Centrifugar por un minuto a 5000 r.p.m. Cuidadosamente tomar la parte intermedia (fase sólida) que separa dos fases acuosas y que corresponde a los glóbulos separados del plasma. El resto del material debe descartarse en un desinfectante (hipoclorito de Na). Añada nuevamente 1 ml de 1×SSC, mezcle por inversión y centrifugue por un minuto (5000 r.p.m.) y remueva el sobrenadante. Al pellet obtenido añada 375 ml de acetato de Na 0.2M, mezcle y añada 25 ml de SDS 10% y 5 ml de proteinasa K (20 mg/ml).

Hacer vortex por 1 minuto e incubar a 56°C por una o dos horas (aunque es posible dejar la digestión durante toda la noche para obtener mejores resultados). La alta concentración del detergente (SDS) destruirá las membranas celulares de los glóbulos, mientras que la incubación de las muestras a 56°C provocará la lisis de los glóbulos rojos.

Añadir un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (25:24:1) y hacer vortex por 30 segundos, centrifugar por dos minutos a 5000 r.p.m. La adición de este solvente orgánico sirve para extraer las proteínas de la muestra. Transfiera la fase acuosa (la superior) a un tubo nuevo, descarte el fenol cloroformo adecuadamente. Añadir 1 ml de etanol absoluto puro frío, mezclar por inversión LENTAMENTE y colocar el tubo a -20°C por 15 o 30 minutos. En este momento se debe observar una mota amarilla formándose en el tubo, corresponde al DNA que debe ser lavado adicionalmente.

Centrifugar por dos minutos (5000 r.p.m.) y descartar el sobrenadante. Asegúrese de eliminar todo el etanol, de ser necesario deje los tubos abiertos en un ambiente libre de contaminación. Resuspenda el pellet en 180 ml de TE, e incube a 56°C por media hora o más si es necesario para disolver el pellet. Agregue 20 ml de acetato de Na 2M y mezcle por inversión varias veces (cada 30 segundos) durante dos minutos.

Añada 500 ml de alcohol frío. Mezcle por inversión suavemente. Centrifugue durante un minuto a 5000 r.p.m. Remueva el sobrenadante. Lave el pellet con 1 ml de etanol 70%. Centrifugue, remueva el sobrenadante y el exceso de alcohol.

Disuelva el pellet en 100 ml de TE y de ser necesario incube a 56°C por 1-2 horas hasta disolver el pellet. Visualice el DNA en un gel de agarosa al 1% en TBE teñido con bromuro de etidio. Almacene a -20°C. Es posible también cuantificar la cantidad de DNA obtenido mediante análisis por espectrofotometría a la longitud de onda en la que los ácidos nucleicos absorben la mayor cantidad de luz.

## 2. Extracción de DNA a partir de sangre fresca, sangre impregnada en papel de filtro con Chelex 100, y a partir de células epiteliales

### a. Sangre Fresca

1. Con una lanceta ESTÉRIL Y NUEVA realice una punción en el dedo índice con el fin de extraer la sangre. Coloque aproximadamente 6 a 8  $\mu$ l de sangre total en un tubo eppendorf que contenga 1 ml de agua
2. Dejar 20–30 min en reposo
3. Centrifugar a 12000 r.p.m por 5 minutos
4. Eliminar el sobrenadante con el uso de micropipeta. Si la solución está muy rojiza hacer otro lavado con agua por 2 minutos
5. Debe quedar aproximadamente 10 ml de agua en el tubo
6. Agregar al pellet 170 ml de chelex al 20% (este se prepara en agua y se esteriliza; para la toma del chelex utilizar tip de punta ancha, se debe garantizar que pase la cantidad de soporte que se necesita)
7. Resuspender suavemente con la mano
8. Incubar a 56°C por 15 minutos
9. Dar vórtex
10. Incubar a 100°C por 8 minutos para romper células
11. Vórtex
12. Centrifugar a 12000 rpm por 2 a 3 minutos
13. En el sobrenadante queda el DNA. Visualizar en gel de agarosa 1% en TBE y teñir con Bromuro de Etidio.

### b. Sangre impregnada en papel de filtro

1. Colocar en un tubo eppendorf una pieza de papel de filtro impregnado con sangre.
2. Agregar 1 ml de agua



3. Dejar 20–30 min en reposo
  4. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos (no es necesario remover la pieza de tela o papel de filtro)
  5. Eliminar el sobrenadante con el uso de micropipeta. Si la solución está muy rojiza hacer otro lavado con agua por 2 minutos
  6. Debe quedar aproximadamente 10 ml de agua en el tubo
  7. Agregar al pellet 170 ml de chelex al 20% (este se prepara en agua y se esteriliza; para la toma del chelex utilizar punta ancha, se debe garantizar que pase la cantidad de soporte que se necesita)
  8. Resuspender suavemente con la mano
  9. Incubar a 56°C por 15 minutos
  10. Dar vórtex
  11. Incubar a 100°C por 8 minutos para romper células
  12. Vórtex
  13. Centrifugar a 12000 rpm por 2 a 3 minutos
  14. En el sobrenadante queda el DNA
- c. A partir de células epiteliales
1. Haga un lavado bucal con 15 ml de solución salina al 0.9% (con sal de cocina) por unos 15 segundos.
  2. Transfíralo a tubos cónicos de 15 ml.
  3. Centrifugue las células epiteliales a 12000 r.p.m. por 10 minutos.
  4. Remueva el sobrenadante.
  5. Transfiera con una punta o con una pipeta pasteur el pellet de células a un tubo eppendorf.

A partir de este momento es posible hacer la extracción por los siguientes métodos:

1. El pellet de células se resuspende en 1 ml de SDS 1% y se incuba por 1-2 horas a 55°C agitando periódicamente. Extraiga con 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamyl (25:24:1); centrifugue por un minuto a 5000 r.p.m. Remueva la capa superior y transfiera a un nuevo tubo. Precipite el DNA con etanol frío y puro. Disuelva el pellet en 100  $\mu$ l de TE y, de ser necesario, incube a 56°C por 1-2 horas hasta disolver el pellet. Visualice el DNA en un gel de agarosa al 1% en TBE o TAE teñido con bromuro de etidio. Cuantifique el DNA mediante espectrofotometría utilizando diluciones del DNA de 1:100. Almacene a 20°C.
2. Coloque el pellet de células en 1 ml de chelex 5% e incube a 56°C varias horas (lo ideal es dejarlo toda la noche), agite constantemente. Agregue 10 ml de proteinasa K (10 mg/ml) y 20 ml de DTT. Al final de la incubación desnaturalice la proteinasa a 94°C por 5 minutos. Haga vortex por 1 minuto y centrifugue por 3 minutos a 3000 r.p.m. La capa superior transparente debe contener DNA. Visualice el DNA en un gel de agarosa al 1% en TBE o TAE teñido con bromuro de etidio. Cuantifique el DNA mediante espectrofotometría utilizando diluciones del DNA de 1:100. Almacene a 20°C. El chelex inhibe cualquier reacción de la PCR por competencia por iones  $Mg^{++}$  necesarios para la actividad de la polimerasa. Asegurese de no tomar chelex cuando agregue el DNA en la reacción de PCR. Una alternativa es transferir la capa transparente después de la centrifugación a otro tubo eppendorf y congelar. El DNA bajo estas condiciones parece ser estable por varios meses, el pH alcalino del chelex al parecer podría también degradar el DNA.

### 3. Separación de ácidos nucleicos mediante electroforesis

Prepare un gel de agarosa al 1% en buffer TBE y 5 ml de Bromuro de etidio. Corra una electroforesis a 70 V por 1 hora. Visualice el DNA bajo luz ultravioleta.

## Cuestionario

1. ¿Qué es la electroforesis, cual es su fundamento?
2. ¿Qué tipos de electroforesis hay y en que casos se utiliza cada una?

3. ¿Qué tipos de sustrato se utilizan para realizar una electroforesis?
4. ¿Porqué razón es posible separar por medio de electroforesis los ácidos nucleicos?
5. ¿En que se fundamenta la utilización de la resina *chelex 100* para extraer DNA?
6. ¿En qué consiste la técnica de salting out para extracción de DNA y cuál es su fundamento?
7. ¿Qué es el Bromuro de Etidio, para qué sirve en estudios de ácidos nucleicos y que cuidados se deben tener con su manejo?
8. ¿Explique el método de espectrofotometría para la cuantificación de ácidos nucleicos, a qué longitud de onda absorbe el DNA?
9. Se realizó una extracción de DNA, se tomó una alícuota de 10 ml en 990 ml en buffer Tris-EDTA. Posteriormente se llevó a análisis de espectrofotometría resultando en una absorbancia de 0.128. ¿Qué concentración de DNA tiene la muestra?
10. ¿Qué aplicación tiene la extracción de ácidos nucleicos en diferentes campos de la investigación?

## Bibliografía

- Alberts B.** *et al.* 1999. Molecular Biology of the Cell. 3 ed. Garland Publishing Inc. New York.
- Lehninger A.** *et al.* 2000. Principles of Biochemistry. 3 ed.
- Klug WS, Cummings MR.** 1999. Conceptos de Genética. 5 ed. Prentice Hall. Madrid.

## CAPÍTULO 26

---

### *Reacción en cadena de polimerasa*

---

#### Introducción

La reacción en cadena de polimerasa (PCR en inglés: *Polymerase Chain Reaction*) es una reacción *in vitro* y que consiste en la síntesis de numerosas copias de un fragmento de DNA en particular. La PCR fue inicialmente descrita por Saiki *et al* (1988). Hoy en día la PCR es utilizada de forma rutinaria en los laboratorios interesados en diferentes tipos de estudios de biología molecular, genética molecular, conservación, epidemiología etc. La PCR requiere un DNA modelo del cual se amplificarán genes particulares o fragmentos de los mismos, nucleótidos libres (A,G,C, y T), un *buffer* o amortiguador para alcanzar ciertas condiciones iónicas necesarias, un par de cebadores o *primers* específicos para el fragmento a amplificar y una enzima polimerasa (generalmente la Taq) que se produce mediante ingeniería genética a partir de la bacteria termoresistente: *Thermus aquaticus*

El ciclo del PCR es relativamente simple y está compuesto por tres pasos principales:

Paso 1. DESNATURALIZACION. La reacción de PCR requiere un modelo (El DNA de interés que se quiere amplificar) de cadena sencilla. El primer paso de la PCR desnatura el DNA, es decir separa las cadenas del DNA

doble, de manera que todo el DNA es de cadena sencilla. Esto permite a los cebadores alinearse al DNA de cadena sencilla en puntos específicos. Un incremento de 94°C por 30-60 segundos normalmente es utilizado para este paso. La eficiencia de la reacción puede disminuir si la temperatura es demasiado baja o el tiempo de desnaturalización es muy reducido, esto es particularmente cierto cuando se trata de DNAs de alto peso molecular. La Taq utilizada no sufrirá daño alguno tras ciclos sucesivos pues proviene de una bacteria que resiste temperaturas de ebullición en su medio natural.

**Paso 2. ALINEAMIENTO DE PRIMERS.** El segundo paso involucra el alineamiento de los cebadores al DNA modelo. Una vez el DNA modelo ha sido desnaturalizado, la temperatura debe disminuirse hasta un nivel apropiado para que los primers se incorporen al DNA. Este es el paso más importante del proceso, una temperatura adecuada permitirá que los *primers* se incorporen a sus sitios específicos (complementarios al DNA modelo). Si la temperatura es muy baja, estos se alinearán al azar en diferentes puntos, como resultado de ello se amplificarán diferentes regiones. Si por el contrario la temperatura es muy alta, los primers no tendrán oportunidad de alinearse. Puesto que esta temperatura depende precisamente de la composición de los primers, esta puede variar desde 45-55°C. por 15 segundos a 2 minutos aproximadamente.

**Paso 3. EXTENSION DE PRIMERS.** La Taq polimerasa trabaja mejor en temperaturas dentro del rango 72-75 C°. El tercer paso involucra un incremento en la temperatura. La polimerasa tiene que agregar nucleótidos en el extremo 3' de los primers que se alinearon al DNA modelo en el paso anterior. Los primers son necesarios para iniciar la reacción pues ninguna polimerasa puede agregar nucleótidos libres al DNA modelo a menos que tenga un cebador.

Los pasos 1, 2 y 3 se repiten aproximadamente 30-35 veces, teóricamente en cada ciclo la cantidad de DNA se duplica con respecto al ciclo anterior. Puesto que una extracción de DNA contendrá numerosas copias de la molécula del DNA del organismo de interés, al final de la reacción y después de tan solo algunas horas la PCR habrá producido millones de copias del fragmento de interés (Figura 26.1).

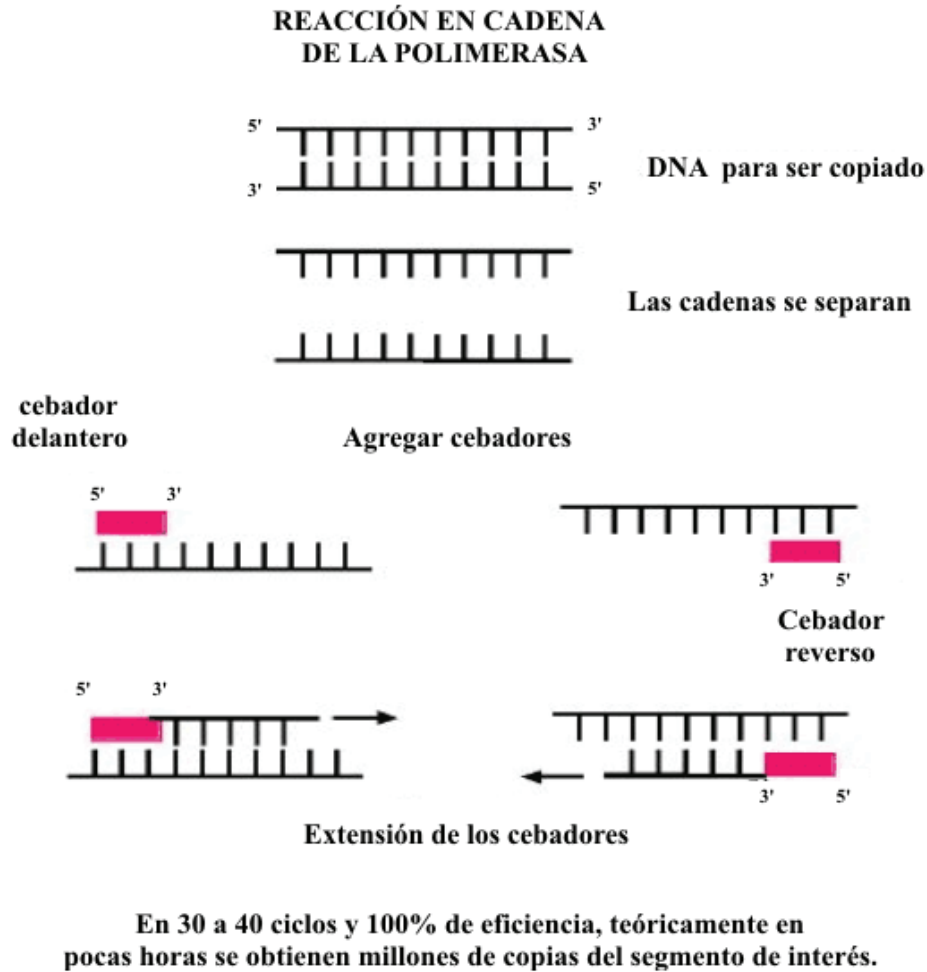


Figura 26.1

La visualización del DNA amplificado se hace mediante geles de agarosa teñidos con Bromuro de Etidio y bajo luz ultravioleta. Normalmente se coloca junto a las muestras en el gel un marcador de peso molecular conocido. Así se puede asegurar que las bandas amplificadas son las del fragmento de interés. Si existen numerosas bandas, o la amplificación no es exitosa, es necesario estandarizar las condiciones particulares para la PCR de ese grupo de organismos y ese gen en particular. En ocasiones estandarizar una

PCR se convierte en labor de detective por parte del investigador. Algunas de las variables que influyen en el éxito de la PCR incluyen: concentración y calidad del DNA, concentración, calidad y especificidad de los primers, concentración del  $Mg^{++}$  cofactor necesario para la acción de las polimerasas, temperatura de alineación y extensión de los primers, número de ciclos, el termociclador utilizado, uso o no de rampas (tiempo que se tarda en alcanzar una temperatura determinada por incremento o disminución, y que el investigador programa en el termociclador).

La práctica incluirá la amplificación mediante PCR de un gen del Complejo de Histocompatibilidad Mayor (MHC). El MHC se divide en dos clases (I y II) de acuerdo a la distribución en los tejidos, la fuente de origen del antígeno, la función, el número de cadenas polimórficas y a los patrones generales de evolución. Los genes de Clase I incluyen HLA DR, DP y DQ, estos son glicoproteínas de transmembrana codificados por un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma seis. Evidencia molecular ha demostrado el polimorfismo en los genes del MHC clase II. Se amplificará un exón del gen HLA-DRB cuyo producto es de 274 pares de bases (pb). Se ha reportado la presencia de pseudogenes con una inserción dentro del gen para un total de 290pb. Es común encontrar individuos con la copia funcional y la copia del pseudogen, o solamente con la copia funcional. Mediante un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio es posible visualizar la presencia de una o de las dos copias. En la práctica intentaremos determinar si dentro de los estudiantes cuyo gen sea amplificado existe también la copia del pseudogen.

## Objetivos

- Familiarizar al estudiante con la práctica de laboratorio denominada PCR.
- Diseñar una práctica de amplificación del DNA (PCR) del fragmento HLA-DRB, y utilizando el DNA de los estudiantes y extraído en prácticas anteriores
- Visualizar los fragmentos amplificados y determinar si existe la copia no funcional del gen (pseudogen) dentro de los estudiantes

## Materiales y reactivos

### Materiales

- Tubos Eppendorf 1.5 y 0.2 ml
- Gradillas
- Bandejas con hielo
- Micropipetas
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Puntas
- Fuente de Poder
- Transiluminador
- Calculadora

### Reactivos

- Agarosa
- dNTPs
- Taq polimerasa
- Buffer de enzima Taq
- Primer delantero y reverso 10 mM
- Agua estéril y desionizada
- Bromuro de etidio

## Procedimiento

Dependiendo de los recursos existentes y del número de estudiantes de la práctica y la calidad del DNA extraído en las prácticas anteriores se decidirá el número de estudiantes que realizarán la amplificación. Los detalles se darán en el laboratorio.

El material necesario para la amplificación (buffer de la enzima, los dNTPs o nucleótidos, y los primers) al igual que el DNA deben mantenerse en hielo mientras se realiza el montaje de la práctica. Ello permite evitar la acción de DNAsas sobre el DNA y los primers, y que el incremento en temperatura pueda dañar los otros reactivos. La enzima es el único reactivo que se saca del congelador justo antes de ser utilizado. Debe trabajar con mucha precaución, use guantes, y trabaje rápido. Idealmente los reactivos y el DNA no deben estar mucho tiempo en hielo y menos a temperatura ambiente. Los tubos y puntas utilizados para la amplificación debe ser material estéril.

Calcule lo necesario para el número de muestras que va a amplificar de cada uno de los reactivos necesarios para la PCR (Tabla 26.1). No incluya el DNA pues cada muestra tendrá su propio DNA.

El volumen total de cada muestra será de 25  $\mu\text{l}$ . Sin embargo, es posible hacer amplificaciones en volúmenes de 12.5, 50 y hasta 100  $\mu\text{l}$ . Para propósitos de control de contaminación de la amplificación, es rutina hacer una muestra adicional (Blanco o negativo) en la que se agregan todos los



Componente	1 Reacción	No reacciones (n)
ddH <sub>2</sub> O	14 $\mu$ l	
Buffer 10 X con Mg 15 mM	2,5 $\mu$ l	
DNTPs 40 mM (A,G,C,T cada uno 10 mM)	0,5 $\mu$ l	
Primer LeftDRB	2,5 $\mu$ l	
Primer RightDRB	2,5 $\mu$ l	
Taq Polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	
DNA	2,5 $\mu$ l	

elementos necesarios excepto un DNA. Por supuesto, la amplificación no debe ser exitosa para esta muestra pues carece de DNA. En caso de observar DNA para esta muestra al visualizar los productos de PCR en agarosa, ello demostraría que uno o más de los reactivos se encuentra contaminados por DNA externo al grupo de organismos de interés. Igualmente puesto que los volúmenes utilizados con tan pequeños, en ocasiones se hacen los cálculos para una muestra adicional al total de muestras a utilizar, eso garantiza que todas las muestras tienen el mismo volumen para llevar a cabo la reacción. Por ejemplo si tiene 10 muestras para amplificar, haga los cálculos para 12 (diez muestras, un negativo, una muestra en exceso). Asegúrese de que sus cálculos están bien hechos, el total obtenido en la mezcla realizada al ser dividida por el número de muestras total deberá ser de 22.5  $\mu$ l, el 2.5  $\mu$ l restante corresponde al DNA de cada una de las muestras.

Prepare una mezcla en un tubo Eppendorf de 1.5 ml para el número de muestras a analizar y de acuerdo a los cálculos obtenidos en la Tabla 26.1. En este tubo deben ir todos los ingredientes excepto el DNA de cada muestra. Cada reactivo debe ser agregado con una punta diferente y que debe ser eliminada. Agregue los reactivos en el orden dispuesto en la Tabla 26.1. Distribuya 22.5  $\mu$ l de la mezcla en cada uno de los tubos para PCR (0.2 ml) previamente marcados en la tapa y en el lado del tubo usando un marcador indeleble. Debe sobrar un pequeño remanente en el tubo, elimínelo.

Agregue finalmente el DNA de cada muestra. Debe llevar un registro del orden e identidad de cada una de las muestras para posterior identificación. Lleve las muestras en hielo al termociclador y prográmelo para las siguientes condiciones.

- Desnaturalización del DNA 94°C - 5 min

- 30 ciclos con las siguientes condiciones:
  1. Desnaturalización 94°C - 30 seg
  2. Alineamiento 50°C - 1 min
  3. Extensión 72°C - 2 min
- Extensión final 72°C - 10 min
- Almacenamiento a 4°C.

Calcule el tiempo aproximado de la PCR. Las amplificaciones se correrán en geles de agarosa al 2% en TBE o TAE y teñidos con bromuro de etidio para permitir visualizar las bandas bajo luz ultravioleta. Tome una fotografía, determine la frecuencia de aparición del pseudogen para las muestras evaluadas de los DNAs de los estudiantes

## Cuestionario

1. En los siguientes escenarios hipotéticos en los que la PCR no funcionó como idealmente uno esperaría, mencione las razones por las que la PCR no pudo haber funcionado. Diseñe un experimento en el que pueda evaluar las variables que considere son las responsables de que la PCR no funcionó perfectamente. Diga como comprobaría que la variable propuesta es la responsable del no funcionamiento de la PCR.
  - (a) No hay productos de PCR
  - (b) Hay bandas brillantes en el pozo del gel
  - (c) Se observa un barrido de bandas a lo largo del gel o hay bandas múltiples
  - (d) Hay bandas en el control negativo
  - (e) Hay Dimeros de Primers
2. ¿Qué criterios se debe tener en cuenta en general para el diseño de primers específicos para una región en particular, en cuanto a longitud, composición de nucleótidos, grado de complementariedad con el DNA modelo. ¿Cómo se diseña un primer en el laboratorio? Existe un límite en el tamaño del fragmento a amplificar? ¿Cómo puedo obtener fragmentos amplificables más grandes de lo común?

3. ¿Qué es amplificación en cadena sencilla y en qué se diferencia de la de cadena doble. ¿Qué aplicación directa pueden tener las dos?
4. ¿Qué elementos adicionales a los utilizados en la PCR descrita en la práctica se utilizan para OPTIMIZAR una reacción de PCR?. ¿Qué efecto tienen específicamente sobre el ciclo de amplificación?
5. ¿En qué consiste la técnica de *Hot Start*?, ¿para qué sirve?
6. Describa y explique la técnica de *PCR in real time* (PCR en tiempo verdadero). ¿Qué utilidad tiene?

## Bibliografía

- Darnell J, Lodish H, Baltimore D.** 1997. Molecular Cell Biology. Scientific American Books 2<sup>nd</sup>. Ed. New York.
- Erlich HA.** 1989. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton press. New York. 246 pp.
- Erlich HH, Gelfand DH, Saiki RK.** 1988. Specific DNA amplification. Nature. 331: 461-462.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ y White TJ.** 1990. PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press: San Diego. 482 pp.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM.** 1996. Genetics. 6<sup>th</sup> Ed. WH Freeman & Co. New York.
- Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA.** 1988. DNA typing from single hairs. Nature. 332: 543-546.
- Lewin B.** 2000. Genes VII. Oxford University Press.
- Saiki RJ, Gelfand DH, Sharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239: 487-491.
- Saiki RJ, Sharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N.** 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -Globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 230: 1350-1354.

- 
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring laboratories Harbor Laboratory Press.
- Stoffet ES, Koeberi DD, Sarkar G, Sommer SS.** 1988. genomic Amplification with transcript sequencing Science. 2139: 491-494.
- Yunis M, Delgado B.** Rapid identification of HLA-DR w53- positive samples by a generic DRB-PCR amplification without further analysis. Tissus Antigens 1992: 40 41-44.



## CAPÍTULO 27

---

### *Análisis del DNA con enzimas de restricción*

---

#### Introducción

El descubrimiento de las endonucleasas de restricción revolucionó la biología molecular. Las enzimas de restricción tipo II cortan el DNA duplex en secuencias de oligonucleótidos en particular, usualmente de cuatro, cinco o seis pares de bases en longitud. Por ejemplo, EcoRI (llamada así por la bacteria de la cual se aisló por primera vez: *Escherichia coli*) actúa cortando el DNA siempre que encuentre la secuencia 5'-GAATTC-3'. Varios cientos de enzimas, la mayoría con secuencias de reconocimiento diferentes, han sido aisladas y caracterizadas de varias cepas de bacterias. En la bacteria, estas enzimas actúan en contra de la invasión de DNA diferente del de la bacteria, en donde el DNA de la bacteria misma es protegido mediante sistemas de metilación. En el laboratorio, las enzimas de restricción tienen amplia aplicación en ensayos como los *RFLPs* (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Todos los RFLPs incluyen el uso de una o más enzimas de restricción, separación de los fragmentos resultantes por peso molecular mediante electroforesis y visualización de los fragmentos cortados mediante bromuro de etidio bajo luz UV. Las diferencias de perfiles de bandas entre individuos resulta de substituciones dentro de los sitios de corte, adiciones o deleciones de DNA, o rearrreglos de la secuencia.

Los análisis de RFLPs son normalmente utilizados para evaluar la variabilidad genética entre organismos, la identificación de perfiles genéticos específicos que permitan la identificación de muestras para las cuales solo se tiene tejido (ej. aplicaciones forenses), o para las pruebas de paternidad. El DNA utilizado puede ser DNA genómico total que posteriormente es hibridado con una sonda en particular (DNAmt total purificado o un gen amplificado), o puede ser un gen previamente amplificado para el cual se conocen las enzimas de restricción que pueden cortar tal fragmento.

Una reacción de digestión con enzimas de restricción contiene el DNA a ser analizado, la enzima de restricción y un buffer específico para cada enzima. El buffer es normalmente proporcionado por la compañía que produce la enzima en una concentración 10X, contiene un agente amortiguador (usualmente Tris) para mantener el pH constante, sal (usualmente NaCl o KCl) para proporcionar la fuerza iónica correcta para la digestión y  $Mg^{++}$  (usualmente del  $MgCl_2$ ) como cofactor necesario para la reacción. Las enzimas de restricción normalmente tienen actividades en el orden de 10–20 Unidades/ml (*las enzimas de la práctica de hoy tienen 10 U/ml*). Una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para digerir 1  $\mu g$  de DNA a 37°C por 1 hora. Un incremento de la temperatura en la reacción o una prolongación del tiempo de digestión puede conllevar a cortes no específicos de las enzimas de restricción sobre el DNA problema. Aunque normalmente los tiempos y temperaturas de incubación se conocen bien para cada enzima, a veces es necesario estandarizar dichas condiciones para los organismos de interés en particular.

## Objetivos

- Familiarizar al estudiante en el uso de enzimas de restricción para estudios moleculares.
- Proveer herramientas en el diseño experimental que permite estandarizar los protocolos de análisis con enzimas de restricción.
- Realizar cortes de restricción en DNA previamente amplificado en genes de interés.
- Desarrollar un taller con un ejemplo particular de aplicación del uso de RFLPs en biología de organismos.

## Materiales y reactivos

### Materiales

- Tubos Eppendorf 1.5 ml
- Gradillas
- Bandejas con hielo
- Micropipetas
- Cámara de electroforésis
- Puntas
- Fuente de Poder
- Transiluminador
- Calculadora

### Reactivos

- Agarosa
- dNTPs
- Enzimas de restricción
- Buffers respectivos de cada enzima
- Agua estéril y desionizada
- Bromuro de etidio

## Procedimiento

Se utilizarán las enzimas de restricción listadas en la tabla 27.1, en la cual se muestran las secuencias específicas de corte, el origen de la enzima y el buffer a utilizar. El DNA utilizado corresponderá a las amplificaciones de genes específicos en la práctica anterior. De no ser exitosa esa amplificación el profesor proporcionará los productos de doble cadena de genes amplificados previamente. Todas las digestiones se deben realizar a 37° C por un período de una hora.

Enzima	Secuencia	Origen	Tipo de buffer
Sau 3AI	5' - GATC - 3'	<i>Staphylococcus aureus</i>	Buffer 4
	3' - CTAG - 5'		
PstI	5' - CTGCA G - 3'	<i>Providencia stuarti</i>	Buffer 2
	3' - G ACGT C - 5'		
XhoI	5' - CTCGAG - 3'	<i>Xanthomonas campestris</i>	Buffer 2
	3' - G AGTC C - 5'		
Taq 1	5' - TGCA - 3'	<i>Thermus aquaticus</i>	Buffer 2
	3' - AGC T - 5'		
BamHI	5' - GGATCC - 3'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Buffer 3
	3' - CCTAG G - 5'		
Eco RI	5' - GAATTC - 3'	<i>Escherichia coli</i>	Buffer 3
	3' - CTTAA G - 5'		

**Tabla 27.1** Secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción utilizadas, con sus respectivos orígenes y buffer necesarios.



Reacción de digestión para un total de 20  $\mu\text{l}$  a 37° C por una hora.

- DNA 6  $\mu\text{l}$
- dd H<sub>2</sub>O 10  $\mu\text{l}$
- 10X buffer de reacción 2  $\mu\text{l}$
- Enzima 2  $\mu\text{l}$

Las reacciones de digestiones se visualizarán con un gel de agarosa (1.5%) teñido con EtBr. Puesto que los fragmentos obtenidos serán relativamente pequeños, se debe correr una electroforésis que separe los fragmentos adecuadamente (ej. 80 V, 1.5 h).

El profesor dará las instrucciones para la distribución de las muestras a digerir de acuerdo a la disponibilidad de las mismas, junto con el acceso a enzimas de restricción y sus respectivos buffers, que pueden variar durante semestres.

Al final de las digestiones y en el gel de agarosa (1.5%) en TBE o TAE los patrones de bandas deberán compararse con marcadores de peso molecular conocido para determinar los perfiles observados

## Cuestionario

1. Qué otros métodos diferentes del bromuro de etidio existen para visualizar DNA y que son utilizados en los RFLPs? Explique su nivel de sensibilidad y principios de funcionamiento.
2. Qué son los RFLPs de DNA clase heteróloga y mediante qué técnica de detecta el DNA?
3. En que difieren las técnicas de Southern, Northern y Western blottings?. En que caso se usa cada una?

## Bibliografía

**Awise J.** 1994. Molecular markers, Natural History and Evolution. 1st ed. Chapman & Hall. New York and London. 511 pp.

- 
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D.** 1997. Molecular Cell Biology. Scientific American Books 2<sup>nd</sup>. Ed. New York.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ y White TJ.** 1990. PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press: San Diego. 482 pp.
- Griffths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM.** 1996. Genetics. 6<sup>th</sup> Ed. WH Freeman & Co. New York.
- Lewin B.** 2000. Genes VII. Oxford University Press.



## CAPÍTULO 28

---

### *Software Vector View*

---

#### Introducción

El software “Vector View” contiene información sobre vectores plasmidícos usados en transformación de plantas, desarrollados por el Centro de Aplicación de la Biología Molecular a la Agricultura Internacional, organización basada en Australia y conocida por la sigla en inglés CAMBIA. En el desarrollo de esta herramienta participaron además científicos del Instituto de Investigación y Desarrollo de la Agricultura Caribeña (Barbados), Instituto de Investigación Fundamental (Bangalore, India), Centro de Desarrollo e Investigación para la Biotecnología (Cibinang, Indonesia), Instituto de Agro biología Molecular (Singapur), Instituto “PhilRice” (Maligaya, Filipinas) y División de Entomología de CSIRO (Canberra, Australia).

**Plásmidos:** Los plásmidos son pequeños segmentos circulares de DNA extracromosómicos, autoreplicables y no esenciales. En bacterias, algunos plásmidos confieren resistencia a toxinas y antibióticos. Han sido encontrados también en levaduras y hongos. Los plásmidos son el componente central de la moderna tecnología asociadas al aislamiento y la clonación de genes.

**Transformación de plantas:** Una de las técnicas más usadas en la in-

roducción de genes foráneos a los genomas vegetales es mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, agente patógeno de la enfermedad conocida como “agalla de corona”. La bacteria transfiere parte de un plásmido denominado Ti (inductor de Tumores), el DNA de transferencia o T-DNA, donde se localizan genes que codifican para la biosíntesis de hormonas vegetales. Este sistema de transferencia génica ha sido utilizado por los biólogos moleculares para construir vehículos de transporte de genes foráneos, conocidos como vectores. La transformación mediada por *Agrobacterium* involucra cocultivo de explantes vegetales y cepas bacterias que transportan el plásmido vector, seguido de cultivo en medios de selección y regeneración, donde finalmente se obtienen las plantas transgénicas.

La Biobalística es otra técnica usada en la ingeniería genética de plantas. Se basa en el aceleramiento de microprojectiles de oro o tungsteno en cañones de gas helio, que se dirigen hacia tejidos vegetales previamente preparados. Fijados físicamente a la superficie de los microprojectiles van los plásmidos que transportan los genes foráneos o transgenes. Posteriormente los tejidos así tratados, se transfieren a medios de selección y regeneración, para obtener las plantas transformadas o genéticamente modificadas.

## Objetivos

- Manipular el software “Vector view” para la construcción de vectores plásmidicos usados en la transformación de plantas.
- Manejar en el contexto informático algunos conceptos usados en la biología molecular, tales como: vector, plásmido, genes marcadores de selección, genes reporteros, transcripción, traducción y trascripción.

## Tipos de vectores

Los tipos de vectores que se presentan en el “Vector View” están organizados en 6 grupos, que se definirán brevemente:

**Grupo 1:** Vectores DIY, pCAMBIA 0380 y pCAMBIA 0390. Se usan para desarrollar construcciones génicas propias, para cada investigador. Contienen sitios de restricción agrupados (polilinker), codones de iniciación y terminación, bordes de T-DNA, señal poliA de NOS (nopalina sintetasa).

Tiene selección para kanamicina en bacterias, alto número de copias en *E. coli* y replicación estable en *Agrobacterium*.

**Grupo 2:** Vectores de mínima selección (MS), pCAMBIA 1200, pCAMBIA 1300, pCAMBIA 1380, pCAMBIA 2200, pCAMBIA 2300, pCAMBIA 1390, pCAMBIA 3200, pCAMBIA 3300. Se usan para transformación de plantas y selección de transformantes. Contienen uno de tres modelos diferentes de genes de selección en plantas bajo el comando del promotor CaMv35S: *hptII* (resistencia a hygromicina), *nptII* (resistencia a kanamicina), *bar* (resistencia a fosfinotricina), y uno de dos genes que confieren resistencia a kanamicina o cloranfenicol en bacterias.

**Grupo 3:** Vectores GUS Intron (GIS), pCAMBIA 1201, pCAMBIA 1301, pCAMBIA 2201, pCAMBIA 2301, pCAMBIA 3201, pCAMBIA 3301. Además de los genes de los vectores MS, contienen versiones del gen *gusA* alterados por un intron proveniente de la enzima Catalasa. Se usa en la optimización de los sistemas de transformación.

**Grupo 4:** Vectores de selección GFP, pCAMBIA 1302, pCAMBIA 1303. Construidos con el mismo propósito de los vectores GIS, este tipo de vectores contienen versiones del gen *gfp* (Proteína verde fluorescente) de *Aequoria victoria* para estudios de expresión in vivo.

**Grupo 5:** Vectores de fusión transcripcional y traduccional, pCAMBIA 1381, pCAMBIA 1391, pCAMBIA 1381xa, pCAMBIA 1391xa, pCAMBIA 1381xb, pCAMBIA 1391xb, pCAMBIA 1381xc, pCAMBIA 1391xc. Fueron diseñados para utilizar el gene *gusA* como un verdadero reportero de la expresión génica y para seguir la rutina del análisis de los direccionamientos de proteínas (cloroplastos, mitocondrias, citoplasma, etc) mediante construcciones que fusionan el gene reportero con la proteína de interés.

**Grupo 6:** Vectores de fusión transcripcional Blue / White, pCAMBIA 1281z, pCAMBIA 1291z, pCAMBIA 1381z, pCAMBIA 1391z. Su principal característica es la servir para seleccionar colonias transformadas de *E. coli*, por la coloración blanca o azulada determinada por la actividad del gene *lac* modificado.

### Principales herramientas:

- Zoom: ampliación (+) disminución (−) mantener (=)
- Traductores proteínas: Directa ( $M \rightarrow \text{ATG}$ ) complementaria ( $\text{ATG} \leftarrow V$ )

- Conformación circular:  $\oplus$
- Conformación lineal:  $\text{---}$
- Búsqueda de secuencia: % ATG
- Selección de secuencia:  $\emptyset$
- Copiar
- Imprimir

**Información adicional:**

- Descripción general
- Autor original
- Componentes
- Mapa de restricción
- Mapa funcional

**Luego de manipular el “vector view” y reconocer sus herramientas, responda las siguientes preguntas de acuerdo con el vector que le han indicado:**

1. ¿Qué son genes reporteros y para qué sirven?
2. ¿Cómo funciona el sistema de gene reportero *gusA*? ¿Por qué hay necesidad de utilizar una versión con intrones?
3. ¿Cómo funciona el sistema de gene reportero *gfp*? Para qué propósitos diferentes del sistema GUS se usa?
4. ¿Por qué estos sistemas de vectores necesitan de genes de selección en bacterias diferentes de los genes de selección en plantas?
5. ¿Cuáles son las características más generales que identifican los vectores plásmidicos usados en la transformación de plantas?
6. Elabore (imprima) un mapa en la versión circular y lineal del vector seleccionado. ¿Cuál es la diferencia?

7. Identifique la secuencia del gen reportero principal y tradúzcala en proteína.
8. Localice la secuencia que corresponde al sitio de inserción múltiple o polilinker, liste las enzimas de restricción que hacen blanco en ese sitio. A propósito, ¿cuál es la utilidad de un “polilinker” en vectores plasmídicos?
9. Identifique la secuencia del gen marcador de selección en plantas y tradúzcala en proteína. ¿Cómo funciona la selección en plantas, basado en este gen particular?
10. Identifique la secuencia del gen marcador de selección en bacterias y tradúzcala en proteína. ¿Cómo funciona la selección en bacterias, basado en este gen particular?
11. ¿Cuáles son los posibles usos del vector plasmídico seleccionado?

## Bibliografía

- Brasileiro AC.** 1998. Manual de transformação Genética de Plantas. Editado por Ana Cristina Miranda Brasileiro y Vera Tavares de Campos Carneiro. Brasília. Embrapa - Cenargen.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW.** 1987. GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO journal. v.6. P. 3901-3907.
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD.** 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature. v. 304. p.184 - 187.
- Murakami T, Anzai H, Imai S, Satoh A, Nagaoka K, Thompson Ch.** 1988. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus* molecular cloning and characterization of the gene cluster. Molecular general genetics. 205: 42 -50.
- Lenhinger A, Nelson D, Cox M.** 1987. Principles of Biochemistry. Worth Publishers. New York.



## Bibliografía de consulta

<http://www.cmrioja.es/asexorate/numero22.html>

<HTTP://WWW.TODOBEBE.COM/SITES/SITECTL/39C225354FD46/7DB6351848495FC47960F2CBB06AF2D8/>

<HTTP://WWW.SEFERTILIDAD.COM/INFOBASICA/INFOGENERAL/QUEES.PHP>

<HTTP://WWW.GEOCITIES.COM/ATHENS/PANTHEON/4689/AGUSTIN5.HTML>

<http://www.terralia.com/revista6/pagina51.htm>

<http://www.terra.es/ciencia/articulo/html/cie5161.htm>

<http://www.huarpe.com/gen/posgrado/temario/xist.html>

[http://www.besthealth.com/spanish/surgery/presentations/100013\\_7070.htm](http://www.besthealth.com/spanish/surgery/presentations/100013_7070.htm)

<http://www.sexoconseil.com/es/sexologia/dispareunia/>

<http://www.cnpge.embrapa.br/publicacoes/doc/doc48/03cicloestral.html>

[http://www.insm.es/glosariogr/glosarionsm/terminos/ficha\\_terminos.php3?c\\_termino=348](http://www.insm.es/glosariogr/glosarionsm/terminos/ficha_terminos.php3?c_termino=348)

<http://www2.uah.es/bioquimica/f-bmig/pregs/resp12.htm>

<http://www.semillas.org.co/b12.php>

<http://www.inia.es/cieex/CUARTO4.HTM>

<http://members.tripod.com/bioclub/pag3001a.htm>

---

<http://www.ciudadfutura.com/remediosnaturales/quistesovarios.htm>

<http://www.uro.com/varicocele.htm>

<http://www.popin.org/unpopterms/files/data/esp01837.htm>

<http://www.eureka.ya.com/webmicrolabs/esterilidad.htm>

<http://www.geocities.com/ResearchTriangle/Lab/2513/quees.htm>

<http://www.terra.es/ciencia/articulo/html/cie5152.htm>

[http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/especiales/genetica/genetica\\_medica.html](http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/especiales/genetica/genetica_medica.html)